

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CARLOS EDUARDO SANCHUKI

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA BACTÉRIA MARINHA *Halomonas hydrothermalis*: PRODUÇÃO DE BIOPLÁSTICO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) E CO-PRODUTOS A PARTIR DE EFLUENTE HORTIFRUTIGRANJEIRO

CURITIBA

2017

CARLOS EDUARDO SANCHUKI

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA BACTÉRIA MARINHA *Halomonas hydrothermalis*: PRODUÇÃO DE BIOPLÁSTICO POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) E CO-PRODUTOS A PARTIR DE EFLUENTE HORTIFRUTIGRANJEIRO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadores:

Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos

Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima

CURITIBA

2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA)
Código CAPES: 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **CARLOS EDUARDO SANCHUKI**, intitulada: "**Potencial biotecnológico da bactéria marinha *Halomonas hydrothermalis*: produção de bioplástico poli(3-hidroxibutirato) e co-produtos a partir de efluente hortifrutigranjeiro**", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

CURITIBA, 16 de Maio de 2017.

MIGUEL DANIEL NOSEDA
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

GLAUCIO VALDAMERI
Avaliador Externo (UFPR)

JAIME PABA
Avaliador Externo (UFPR)

NADIA KRIEGER
Avaliador Interno (UFPR)

JOSÉ GREGÓRIO CABRERA GOMEZ
Avaliador Externo (USP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof^o Dr. Miguel D. Nosedá, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este projeto, por seus ensinamentos e pelo companheirismo ao longo deste percurso.

Aos meus co-orientadores Prof^o Dr. André O. S. Lima e Prof^o Dr. Marcelo M. dos Santos pela ajuda durante todo o desenvolvimento deste projeto.

Aos professores Dr. Jaime Paba e Dr^a. Nadia Krieger pelas correções e considerações nos relatórios desenvolvidos ao longo do projeto.

À coordenação do curso de pós-graduação em Bioquímica e aos professores do departamento de Bioquímica.

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Ao Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI) pelo espaço concedido para a realização de parte dos experimentos.

A todos os técnicos que auxiliam de forma direta e indiretamente as pesquisas desenvolvidas no departamento de Bioquímica.

Aos colegas da UFPR e do SENAI pela ajuda e por todas as trocas de ideias fundamentais no nosso aprendizado.

A minha esposa, Heloisa B. Soligo Sanchuki por todo seu carinho, atenção e paciência em todos os momentos, mesmo naqueles em que estive somente de corpo presente. Estaremos sempre juntos.

A minha família por estarem sempre presentes em todos os momentos, sem vocês não chegaria a este momento.

Ao Mendelino por demonstrar que uma abanada de rabo pode fazer com que todos os problemas desapareçam.

Aos amigos, sempre essenciais em nossa vida!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar e avaliar o potencial biotecnológico da bactéria marinha *Halomonas hydrothermalis* na produção de polihidroxibutirato P(3HB) utilizando efluente proveniente do descarte de hortifrutigranjeiros como única fonte de carbono, assim como seu potencial na produção de biossurfactante e enzimas hidrolíticas. Foi identificado por cromatografia líquida de troca aniônica de alto desempenho acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) que o efluente utilizado apresenta em sua composição frutose (≈ 25 g/L) e glucose (≈ 14 g/L) como principais constituintes, além de possuir composição relativamente estável ao longo do ano. Devido à grande carga de micro-organismos nativos presentes no efluente, foram testados os métodos de descontaminação por pasteurização, calagem com aquecimento por vapor fluente e a esterilização em autoclave. Apesar de promover a degradação térmica parcial de certas moléculas com a formação de compostos como os ácidos fórmico e acético identificados por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H a esterilização se mostrou mais vantajosa para o tratamento do efluente estudado. Utilizando o efluente tratado como única fonte de nutrientes foi possível cultivar *H. hydrothermalis* com biomassa total de 7,61 g/L e produção de P(3HB) na concentração de 3,16 g/L em 48 h de cultivo. O biopolímero produzido foi extraído e caracterizado pelas técnicas de RMN, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e análise termogravimétrica (TGA) demonstrando características físico-químicas compatíveis com o P(3HB) comercial e as relatadas na literatura. O organismo estudado também demonstrou capacidade de produzir as enzimas amilase, celulase, lipase, pectinase e protease quando submetido ao crescimento em meio contendo os respectivos substratos como fonte de carbono. Além das enzimas foi identificado, através dos testes de emulsificação em querosene e dispersão de gota, que este micro-organismo produz biossurfactante. O estudo permitiu definir o processo necessário para a utilização do efluente de hortifrutigranjeiros como meio de cultura para produção de P(3HB) pela bactéria marinha *H. hydrothermalis*, bem como identificar a produção de outras biomoléculas bioativas caracterizando o seu potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Polihidroxialcanoatos, *Halomonas hydrothermalis*, hidrolases, biossurfactantes, efluente, hortifrutigranjeiros.

ABSTRACT

The overall goals of the study were: to evaluate the biotechnological potential of the marine bacterium *Halomonas hydrothermalis* in the production of polyhydroxybutyrate P(3HB) using the effluent from discarded fruit and vegetables as unique culture medium, as well as its potential in the production of biosurfactant and hydrolytic enzymes. It was identified by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) that the effluent used has fructose (≈ 25 g/L) and glucose (≈ 14 g/L) as its main constituent and has a relatively stable composition throughout the year. Due to the effluent contamination by native microorganisms, pasteurization, liming with steam heating and autoclaving were tested as decontamination processes. Despite the partial thermal degradation of certain molecules and formation of compounds such as formic and acetic acids, identified by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR), sterilization proved to be the more advantageous treatment for the studied effluent. Using the treated effluent as the sole nutrient source it was possible to grow *H. hydrothermalis* reaching a total biomass of 7.61 g/L and P(3HB) production of 3.16 g/L. The biopolymer produced was extracted and characterized by NMR, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA), demonstrating physicochemical characteristics compatible with commercial P(3HB) and those reported in the literature. The studied microorganism also demonstrated the ability to produce the enzymes amylase, cellulase, lipase, pectinase and protease when cultivated with the respective substrates as the sole carbon source. In addition, the ability of the microorganism to produce biosurfactant was identified using the kerosene emulsification and droplet dispersion tests. In the present study the process that allows the use of discarded fruit and vegetables effluent as sole culture medium for P(3HB) production by *H. hydrothermalis* was defined, as well as the production of other bioactive molecules was identified characterizing its biotechnological potential.

Keywords: polyhydroxyalkanoates, *Halomonas hydrothermalis*, hydrolases, biosurfactants, discarded fruit and vegetables effluent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral dos polihidroxicanoatos.....	18
Figura 2. (A) Estrutura química do poli(3-hidroxiбутирато); (B) Representação esquemática dos grânulos de P(3HB) e respectivas proteínas associadas	19
Figura 3. Vias metabólicas envolvidas na síntese do polihidroxiбутирато. (PhaA) β -cetotiolase; (PhaB) acetoacetil-CoA; (PhaC) PHA	20
Figura 4. Exemplo de estruturas químicas dos biossurfactantes e bioemulsificantes.	25
Figura 5. Localização dos compactadores presentes na central de abastecimento do Paraná na unidade Curitiba.	38
Figura 6. Fluxograma da coleta e processamento do efluente hortifrutigranjeiro proveniente da central de abastecimento do Paraná.....	38
Figura 7. Efeito da temperatura no crescimento celular.....	51
Figura 8. Efeito do pH no crescimento celular.....	52
Figura 9. Efeito da concentração de NaCl no crescimento celular.....	53
Figura 10. Avaliação do crescimento celular em função da fonte de carbono.....	54
Figura 11. Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas por <i>H. hydrothermalis</i>	56
Figura 12. Análise dos carboidratos simples solúveis presentes no efluente por CCD.....	58
Figura 13. Comparação dos espectros de RMN de ^{13}C do efluente bruto e padrões de carboidratos.	58
Figura 14. Avaliação do crescimento celular no efluente como única fonte de nutrientes.	61
Figura 15. Concentração de P(3HB) intracelular produzido utilizando o efluente diluído a 50 % (v/v) como fonte de nutrientes.	62
Figura 16. Efeito da diluição do efluente no crescimento celular.	63
Figura 17. Variação do pH após a esterilização conforme concentração do efluente (pH inicial 7,5).....	64
Figura 18. Avaliação do crescimento celular com o efluente nas concentrações entre 50 e 60 % (v/v).	65
Figura 19. Avaliação do crescimento celular em função da concentração de ácido cítrico.	66
Figura 20. Cromatografia em camada delgada do efluente após a esterilização.....	68
Figura 21. Espectros de RMN de ^1H de HMF e efluente após esterilização.....	69
Figura 22. Espectros de RMN de ^1H de (A) HMF e (B) efluente esterilizado acrescido de HMF.	69
Figura 23. Comparação dos espectros de RMN de ^1H para o efluente bruto	71

Figura 24. Espectro de RMN de ^1H da solução similar ao efluente esterilizado.....	72
Figura 25. Concentrações de glucose e frutose nos efluentes bruto e esterilizado.....	73
Figura 26. Avaliação da redução da carga microbiana no efluente (A) Pasteurizado, (B) esterilizado, (C) tratado com vapor fluente (105 °C por 20 min) e (D) sem tratamento.....	75
Figura 27. Avaliação da redução da carga microbiana nos tratamentos com pH corrigido com NaOH e (A) Pasteurizado; (B) Esterilizado; e (C) Vapor fluente (105 °C por 20 min).....	76
Figura 28. Avaliação da redução da carga microbiana nos tratamentos utilizando calagem e (A) Pasteurização; (B) Esterilização; (C) Vapor fluente (105 °C por 10 min); (D) Vapor fluente (105 °C por 20 min); e (E) Vapor fluente (105 °C por 30 min).....	76
Figura 29. Comparação do crescimento celular utilizando efluente esterilizado (A) ou tratamento CA20 (B).	78
Figura 30. Concentração de P(3HB) intracelular dos cultivos utilizando efluente esterilizado (A) e tratado CA20 (B).....	79
Figura 31. Concentração de P(3HB) nos cultivos utilizando os efluentes esterilizado (A) e tratado CA20 (B).	80
Figura 32. Avaliação do crescimento celular no efluente destoxificado por overliming (Over.) ou carvão ativado nas concentrações de 100 g/L (C100), 50 g/L (C50) e 33 g/L (C33).	81
Figura 33. Efeito da correção do pH com NaOH na produção de biomassa com o efluente esterilizado.....	82
Figura 34. Avaliação do crescimento de <i>H. hydrothermalis</i> utilizando os diferentes lotes de efluentes coletados.....	83
Figura 35. Avaliação da técnica de citometria de fluxo para a identificação de P(3HB) em <i>H. hydrothermalis</i>	84
Figura 36. Crescimento relativo da bactéria utilizando acetato, citrato e formiato como fonte de carbono.....	85
Figura 37. Avaliação da produção de P(3HB) utilizando acetato, citrato e formiato como suplementação da fonte de carbono.....	86
Figura 38. Crescimento relativo de <i>H. hydrothermalis</i> em diferentes concentrações de acetato.	87
Figura 39. Efeito da concentração de acetato na produção de P(3HB).	88
Figura 40. Percentual de P(3HB) intracelular nos diferentes tratamentos.	89
Figura 41. Correlação entre fluorescência e percentual de P(3HB) intracelular nos diferentes tratamentos.	89
Figura 42. Via metabólica para a produção de P(3HB) a partir de glucose e acetato.	90

Figura 43. Efeito da concentração de glucose na produção de P(3HB).	92
Figura 44. Efeito da glucose [Glc], frutose [Fru] e da mistura frutose mais glucose [Glc+Fru] na produção de P(3HB).	93
Figura 45. Biomassa seca (A) e P(3HB) intracelular (B) obtidos nas diferentes relações C/N94	
Figura 46. Diagrama de Pareto demonstrando os efeitos observados das variáveis na produção de P(3HB).....	96
Figura 47. Espectro de RMN de ^1H do poli(3-hidroxibutirato) produzido por <i>H. hydrothermalis</i> utilizando o efluente como única fonte de nutrientes.....	100
Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C do poli(3-hidroxibutirato) produzido por <i>Halomonas hydrothermalis</i> utilizando o efluente como única fonte de nutrientes.....	100
Figura 49. Análise de TGA do P(3HB) produzido por <i>H. hydrothermalis</i> utilizando o efluente de hortifrutigranjeiros como única fonte de nutriente e amostra comercial de P(3HB).....	101
Figura 50. Espectro de FTIR do P(3HB) produzido por <i>H. hydrothermalis</i> utilizando o efluente como única fonte de nutrientes	102
Figura 51. Avaliação da produção de biossurfactante pela bactéria <i>H. hydrothermalis</i>	103
Figura 52. Análise de proteínas e carboidratos totais da fração BH1.....	104
Figura 53. Espectro de infravermelho da fração BH1.....	105
Figura 54. Perfil de eluição da cromatografia de exclusão molecular da fração BH1.	106
Figura 55. Fluxograma de purificação/fracionamento realizado no sobrenadante do cultivo de <i>H. hydrothermalis</i>	107
Figura 56. Ação emulsificante em querosene das frações obtidas após as etapas de purificação	108
Figura 57. Perfil de eluição das frações BH1 e BH4 por cromatografia de exclusão molecular com detecção por MALLS, IR e UV.....	108
Figura 58. Perfil de eluição das frações BH8, BH9, BH11 e BH16 por cromatografia de exclusão molecular com detecção por MALLS, IR e UV.....	109

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Empresas produtoras de polihidroxialcanoatos ao redor do mundo e características de produção.....	21
Quadro 1. Exemplos de biossurfactantes e bioemulsificantes, micro-organismos produtores e possíveis aplicações.....	24
Quadro 2. Aplicações industriais de enzimas microbianas	27
Tabela 2. Produção de poli(3-hidroxibutirato) por micro-organismos do gênero Halomonas utilizando diferentes fontes de carbono.	30
Quadro 3. Produção de biossurfactantes/bioemulsificantes por micro-organismos do gênero Halomonas.	31
Tabela 3. Quantidade de resíduos orgânicos gerados nas centrais de abastecimento do Paraná.	33
Tabela 4. Parâmetros utilizados nos métodos de descontaminação microbiológica do efluente	41
Tabela 5. Níveis das variáveis independentes utilizadas no Plackett-Burman.....	45
Tabela 6. Níveis das variáveis independentes utilizadas no delineamento composto central rotacional.	46
Quadro 4. Descrição das metodologias aplicadas na separação e purificação do biossurfactante.....	49
Tabela 7. Caracterização físico-química do efluente coletado em diferentes datas.	57
Tabela 8. Quantidade de carboidratos solúveis em frutas, legumes e vegetais.	59
Tabela 9. Valores de grau Brix e pH pré e pós-tratamentos para descontaminação do efluente	77
Tabela 10. Matriz de experimentos e respostas observadas para a produção de P(3HB) utilizando o planejamento experimental Plackett-Burman.....	96
Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de P(3HB).....	97
Tabela 12. Matriz de experimentos e respostas observadas do delineamento composto central rotacional (DCCR) para a produção de poli(3-hidroxibutirato) com as variáveis tempo e pH inicial	98
Tabela 13. Valores de regressão das variáveis tempo (X_1) e pH inicial (X_2) e suas interações obtidos pelo delineamento composto central rotacional (DCCR).....	98
Tabela 14. Análise de variância obtidos no delineamento composto central rotacional (DCCR)	

utilizando as variáveis independentes tempo (X_1) e pH inicial (X_2)	98
Tabela 15. Propriedades de temperatura de fusão (T_m), transição vítrea (T_g) e temperatura de decomposição (T_{dec}) do poli(3-hidroxibutirato) produzido por <i>Halomonas hydrothermalis</i> em comparação ao produto comercial e dados da literatura.....	101

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, TERMOS E ABREVIATURAS

^1H	próton
^{13}C	carbono 13
ATP	adenosina trifosfato
CA20	tratamento do efluente por calagem e aquecimento a 105°C por 20 min
CT	tratamento do efluente por calagem
g/L-C	concentração em gramas por litro com base em carbono
HA	hidroxialcanoatos
m/v	relação massa por volume
Mcl-PHAs	polihidroxialcanoatos com monômeros de cadeia média
DO ₆₀₀	densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm
pH	potencial hidrogeniônico
PHA	polihidroxialcanoatos
P(3HB)	poli(3-hidroxibutirato)
P(3HHx)	poli(3-hidroxihexanoato)
P(3HB-co-4HB)	poli(3xibutirato-co-4-hidroxibutirato)
P(HB-co-HV)	poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)
PT	tratamento térmico por pasteurização
RMN	ressonância magnética nuclear
rpm	rotações por minuto
Scl-PHAs	polihidroxialcanoatos com monômeros de cadeia curta
TT	tratamento térmico do efluente
TpH	tratamento do efluente com correção do pH com NaOH
v/v	relação volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Importância biotecnológica dos micro-organismos marinhos.....	16
1.2 Polihidroxialcanoatos	17
1.2.1 Poli(3-hidroxiбутирато).....	19
1.3 Biossurfactantes e bioemulsificantes.....	23
1.4 Enzimas hidrolíticas	26
1.5 O gênero Halomonas como produtor de biomoléculas	29
1.6 Resíduos provenientes de hortifrutigranjeiros em centrais de abastecimento.....	32
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Isolamento, identificação e manutenção do micro-organismo	35
3.2 Efeito da temperatura, pH e concentração de NaCl no crescimento celular	36
3.3 Análise do crescimento celular em diferentes fontes de carbono	36
3.4 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas por Halomonas hydrothermalis.....	37
3.5 Coleta do efluente de hortifrutigranjeiros, estoque e caracterização dos principais componentes	37
3.6 Quantificação da biomassa seca e poli(3-hidroxiбутирато) por gravimetria	39
3.7 Avaliação do crescimento celular e produção de poli(3-hidroxiбутирато) utilizando o efluente	39
3.8 Produção de poli(3-hidroxiбутирато) utilizando o efluente como única fonte de nutrientes	40
3.9 Métodos alternativos à esterilização para descontaminação microbiológica do efluente	40
3.10 Avaliação dos métodos de destoxificação do efluente	41
3.11 Análise da produção de poli(3-hidroxiбутирато) por citometria de fluxo	42
3.12 Quantificação do poli(3-hidroxiбутирато) por cromatografia gasosa	42

3.13 Influência dos ácidos acético, cítrico e fórmico sobre a produção de poli(3-hidroxibutirato).....	43
3.14 Influência da glucose e frutose na produção poli(3-hidroxibutirato).....	43
3.15 Efeito da relação carbono e nitrogênio (C/N) no acúmulo de poli(3-hidroxibutirato) intracelular.....	44
3.16 Otimização da produção de poli(3-hidroxibutirato).....	45
3.16.1 Seleção das variáveis do processo que afetam a produção de poli(3-hidroxibutirato).....	45
3.16.2 Otimização da produção de poli(3-hidroxibutirato) por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	45
3.17 Caracterização do poli(3-hidroxibutirato) produzido utilizando o efluente como única fonte de nutrientes.....	46
3.18 Avaliação prévia da produção de biossurfactante por <i>Halomonas hydrothermalis</i> ..	47
3.19 Caracterização da fração BH1 contendo o biossurfactante	48
3.20 Estratégias de separação e purificação parcial do biossurfactante	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Efeito da temperatura, pH e concentração salina no crescimento celular	51
4.2 Análise do crescimento celular em diferentes fontes de carbono	53
4.3 Produção de enzimas hidrolíticas por <i>Halomonas hydrothermalis</i>	55
4.4 Caracterização do efluente de hortifrutigranjeiros	57
4.5 Produção de biomassa e poli(3-hidroxibutirato) utilizando o efluente como única fonte de nutrientes	60
4.5.1 Efeito do ácido cítrico sobre o crescimento celular	65
4.5.2 Avaliação da presença de resíduos de agrotóxicos	67
4.5.3 Avaliação da presença de hidroximetilfurfural no efluente após esterilização ..	67
4.5.4 Avaliação da formação de outros produtos de degradação durante o processo de esterilização do efluente	70
4.6 Avaliação dos métodos para descontaminação microbiana do efluente	74
4.7 Avaliação dos métodos de destoxificação do efluente	80

4.8 Influência dos ácidos acético, cítrico e fórmico na produção de poli(3-hidroxibutirato)	83
4.9 Efeito da glucose e frutose na produção de poli(3-hidroxibutirato).....	91
4.10 Influência da relação carbono/nitrogênio na produção de poli(3-hidroxibutirato) ...	93
4.11 Otimização da produção de poli(3-hidroxibutirato) utilizando o efluente como única fonte de nutrientes	95
4.11.1 Seleção das variáveis do processo que afetam a produção de poli(3-hidroxibutirato).....	95
4.11.2 Otimização da produção de poli(3-hidroxibutirato) pela metodologia de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	97
4.12 Caracterização do poli(3-hidroxibutirato)	99
4.13 Avaliação da produção de biossurfactante pela bactéria <i>Halomonas hydrothermalis</i>	102
4.14 Caracterização da fração BH1 obtida a partir do cultivo de <i>Halomonas hydrothermalis</i>	104
4.15 Purificação da fração BH1 e métodos alternativos para a extração do biossurfactante	106
5. CONCLUSÕES	110
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8. ANEXOS	132
8.1 Substâncias analisadas no ensaio de multirresíduos de agrotóxicos realizado pelo Laboratório de Agroquímica do Instituto de Tecnologia do Paraná.	132

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância biotecnológica dos micro-organismos marinhos

O ambiente marinho abrange a maior parcela da superfície terrestre com aproximadamente 365 milhões de km² e com profundidade média de 4.000 m, podendo chegar a profundidades superiores as 11.000 m na Fossa das Marianas localizadas no Oceano Pacífico (SATPUTE; BANAT; *et al.*, 2010; ORCUTT *et al.*, 2011). Este ambiente pode ser considerado uma promissora fonte para a prospecção de novas biomoléculas devido à alta diversidade de micro-organismos. Em alguns habitats marinhos o número de células pode chegar a 10⁶-10⁹ por mililitro e com diversidade superior a muitas florestas tropicais (SOGIN *et al.*, 2006; PENESYAN *et al.*, 2010). Diversos estudos já demonstram a diversidade microbiana presente em diferentes ambientes marinhos, sendo esta normalmente atrelada a vários fatores tais como, local geográfico, profundidade, tipo de amostra (água ou sedimento) e estação do ano (SOGIN *et al.*, 2006; SILVA, DA *et al.*, 2013; LADAU *et al.*, 2013).

As condições ambientais presentes no ecossistema marinho, tais como salinidade, pressão e temperatura, forçam os organismos pertencentes a este ambiente a desenvolverem novas capacidades metabólicas e fisiológicas para garantir a sobrevivência em condições desfavoráveis (JENSEN; FENICAL, 1996; NERURKAR *et al.*, 2009; CARVALHO, DE; FERNANDES, 2010). Para vários micro-organismos, as pressões ambientais levam a novas estratégias adaptativas, tornando-os mais resistentes que os demais e desta forma mais promissores a processos industriais em que condições extremas sejam requeridas (ARUN *et al.*, 2009; QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2010; SATPUTE; BANAT; *et al.*, 2010; POLI *et al.*, 2011a).

Devido à habilidade de produzir uma grande variedade de produtos de interesse biotecnológico, os micro-organismos marinhos têm ganhado maior atenção nos últimos anos (QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2015). Atualmente os principais focos de interesse neste ambiente estão correlacionados com a diversidade microbiana nos diferentes habitats marinhos (JENSEN; FENICAL, 1996; SILVA, DA *et al.*, 2013) e os estudos na produção de compostos de interesse médico e industrial (ZHAO, 2011; DALMASO *et al.*, 2015; EDRADA-EBEL; JASPAR, 2015).

Como exemplo de biomoléculas estudadas a partir de micro-organismos pertencentes ao ecossistema marinho, pode-se citar os biossurfactantes com diferentes composições e aplicações (NERURKAR *et al.*, 2009; SATPUTE; BANAT; *et al.*, 2010; WHITE *et al.*, 2013;

DHASAYAN *et al.*, 2014; GUDIÑA *et al.*, 2016), as enzimas hidrolíticas de diferentes classes, tais como amilases, lipases e proteases (QU *et al.*, 2011; GURUNG *et al.*, 2013; KIRAN; LIPTON; *et al.*, 2014; DALMASO *et al.*, 2015), os biopolímeros com propriedades termoplásticas da classe dos polihidroxialcanoatos (POLI *et al.*, 2011b; WEI *et al.*, 2011; CIESIELSKI *et al.*, 2014; WECKER *et al.*, 2015) e compostos terapêuticos com atividades antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticoagulante (HAEFNER, 2003; PENESYAN *et al.*, 2010; D’ORAZIO *et al.*, 2012; KANG, H.-K. *et al.*, 2015; KANG, H. K. *et al.*, 2015).

A produção destas biomoléculas pode ser verificada a partir de várias espécies bacterianas, sendo estes micro-organismos encontrados desde águas superficiais até sedimentos de grande profundidade. Devido à grande dispersão destes organismos ao redor do globo e também as diferentes pressões ambientais sofridas, as biomoléculas produzidas por estes micro-organismos podem possuir características diferentes das já descritas e pesquisadas, possuindo, desta forma, maior interesse industrial (RAHMAN *et al.*, 2010; ROCHA-MARTIN *et al.*, 2014; KANG, H. K. *et al.*, 2015).

1.2 Polihidroxialcanoatos

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são biopolímeros da classe dos poliésteres que apresentam propriedades termoplásticas similares aos polímeros derivados de petróleo: poliestireno e polipropileno (Chen and Wu, 2005; Peña *et al.*, 2014). Esta classe de biopolímeros pode ser acumulada por diversos micro-organismos na forma de grânulos intracelulares, sendo a única família de polímeros que atua como reserva de carbono/energia para mais de 300 espécies de bactérias Gram-positivas e negativas, assim como para algumas espécies de Archaea (REHM, 2003; LAYCOCK *et al.*, 2014).

PHAs são acumulados pelas células como inclusões citoplasmáticas hidrofóbicas, sendo o número e tamanho destas inclusões variáveis de acordo com a espécie do organismo e a condição a qual é submetido (RAI; ROY, 2011). A síntese de PHAs está normalmente associada ao crescimento em condições desbalanceadas, tanto em relação aos nutrientes presentes no meio de cultivo quanto às condições de oxigenação e temperatura (KOLLER *et al.*, 2010). Como principal condição relatada para estimular a produção desta classe de biomoléculas está o excesso da fonte de carbono e a deficiência de algum outro nutriente, como por exemplo, o nitrogênio ou fósforo (LEE, 1996). Outro fator importante na produção

desta biomolécula é a fonte de carbono fornecida durante o cultivo, que pode gerar concentrações e composições diferenciadas de PHAs (DJONLAGIC; NIKOLIC, 2011; KHOSRAVI-DARANI *et al.*, 2013). Apesar de algumas similaridades nas condições em que estes polímeros são produzidos, as rotas metabólicas podem variar conforme a classe do PHA produzido, espécie do organismo e fonte de carbono fornecida (TAN, G. Y. A. *et al.*, 2014).

Os PHAs apresentam estrutura linear formada por poliésteres de hidroxialcanoatos (HAs). Neste polímero, o grupo carboxila de um monômero forma uma ligação tipo éster com o grupo hidroxila do monômero vizinho (Figura 1). Dependendo do número de carbonos na cadeia principal e da composição das cadeias laterais, os PHAs podem apresentar variações em suas propriedades físicas, variando de plásticos rígidos e brilhantes a fortes elastômeros (SUDESH *et al.*, 2000).

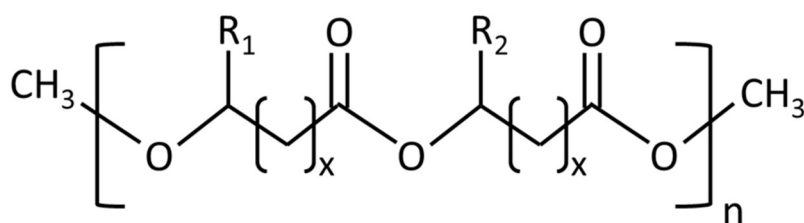


Figura 1. Estrutura geral dos polihidroxialcanoatos. R1 e R2 correspondem ao tipo de cadeias laterais (alcanos variando entre C1 – C13), X corresponde ao número de grupos CH₂ presentes na estrutura podem variar de 1 a 4. Fonte: adaptado de Rai & Roy, (2011).

Com base na composição da cadeia principal, estes polímeros podem ser classificados em: PHAs de cadeia monomérica curta ou Scl-PHAs (*short-chain lenght PHAs*) que possuem entre 3 a 5 átomos de carbono na unidade monomérica, e PHAs de cadeia monomérica média ou Mcl-PHAs (*medium-chain lenght PHAs*), que possuem entre 6 e 14 átomos de carbono na unidade monomérica (Możejko-Ciesielska and Kiewisz, 2016; Rai and Roy, 2011). Os PHAs podem ser classificados também em homopolímeros, quando apresentam apenas uma classe de unidade monomérica na composição como, por exemplo, o poli(3-hidroxibutirato) P(3HB) e o poli(3-hidroxihexanoato) P(3HHx) e em heteropolímeros, quando apresentam mais de uma unidade monomérica na composição como, por exemplo, o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivaletato) P(3HB-co-3HV) (LEE, 1996; DJONLAGIC; NIKOLIC, 2011). Devido à sua composição, estes polímeros apresentam propriedades físico-químicas diferentes. De uma forma geral, os Scl-PHAs apresentam características rígidas e quebradiças, enquanto os Mcl-PHAs são elastoméricos. Estas diferenças permitem a aplicação destes polímeros em diversas finalidades (LAYCOCK *et al.*, 2014). Atualmente, podem ser encontrados pelo menos

noventa tipos diferentes de monômeros que constituem os PHAs, sendo o P(3HB) o mais comum dos PHAs e extensivamente estudado ao longo dos anos (SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007; CAVALHEIRO *et al.*, 2012).

1.2.1 Poli(3-hidroxibutirato)

O P(3HB) é um homopolímero da classe dos polihidroxialcanoatos composto por monômeros de ácido-3-hidroxibutírico e, desta forma, é classificado com Scl-PHAs (Figura 2a). Durante a síntese, o P(3HB) é organizado na forma de grânulos intracelulares recobertos por uma membrana fosfolipídica associada a proteínas com as funções de síntese, despolimerização e regulatória. Dentre estas proteínas encontram-se a enzima PHA sintase (PhaC), a enzima PHA despolimerase (PhaZ), que possui como principal função a degradação do polímero para conversão em fonte de carbono e as PHAsinas (PhaP), que possuem funções regulatórias durante a síntese e formação dos grânulos (Figura 2b) (YORK *et al.*, 2001; REHM, 2003; STUBBE; TIAN, 2003; BEEBY *et al.*, 2012).

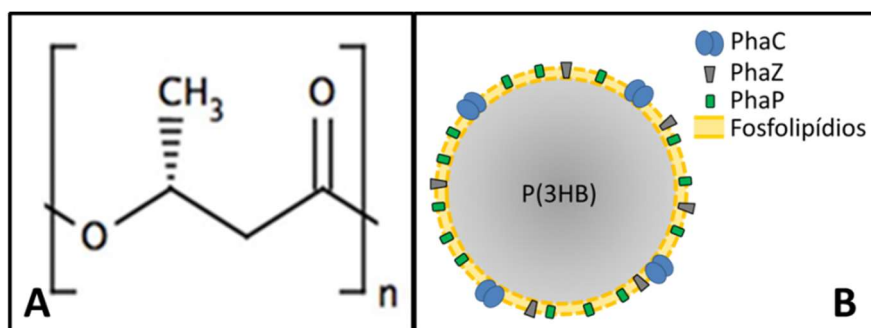


Figura 2. (A) Estrutura química do poli(3-hidroxibutirato); (B) Representação esquemática dos grânulos de P(3HB) e respectivas proteínas associadas. Fonte: adaptado de Lee, 1996; Rehm, 2003.

Este polímero pode ser produzido por diversas espécies de micro-organismos e sua síntese envolve basicamente três reações enzimáticas a partir do acetil-CoA. A primeira reação (Figura 3) é a condensação de duas moléculas de acetil-CoA pela enzima β -cetotilase (PhaA) com formação do acetoacetil-CoA, que em seguida será reduzido a (R)-3-hidroxibutiril-CoA pela acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente (PhaB). Por fim, ocorre a polimerização dos monômeros de ácido-3-hidroxibutírico pela enzima PHA sintase (PhaC) (SUDESH *et al.*, 2000; REHM, 2003). Porém, quando a fonte de carbono utilizada é o ácido butírico ou ácidos graxos, a via metabólica sofre algumas modificações, tendo como

intermediário o (S)-3-Hidroxibutiril-CoA, que será convertido em acetoacetil-CoA pela enzima acetoacetil-CoA redutase NADH dependente (SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007).

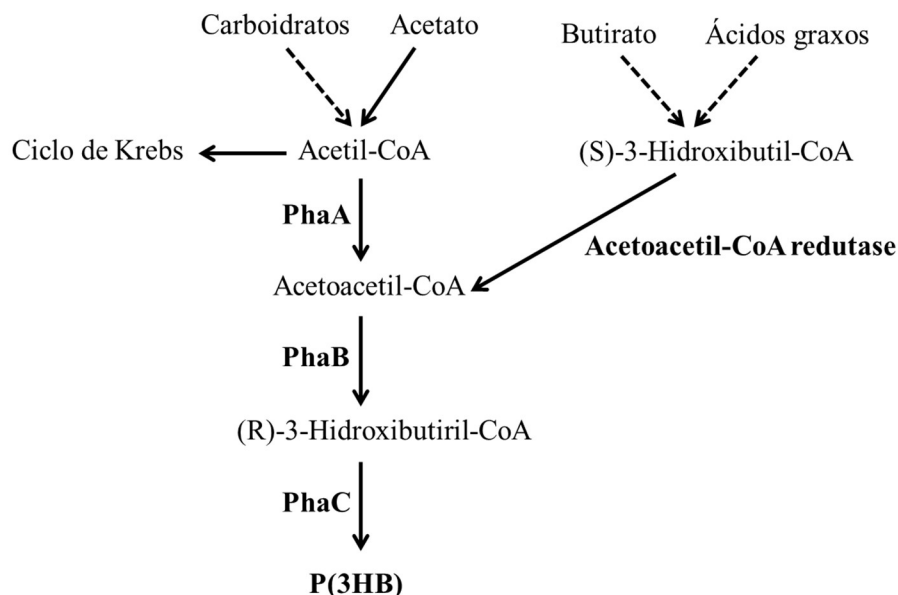


Figura 3. Vias metabólicas envolvidas na síntese do polihidroxibutirato. (PhaA) β -cetotiolase; (PhaB) acetoacetil-CoA; (PhaC) PHA sintase e (P(3HB) poli(3-hidroxibutirato). Fonte: adaptado de (SUDESH *et al.*, 2000).

Assim como outros polihidroxicanoatos, o P(3HB) possui ótimas propriedades termoplásticas, elevada biodegradabilidade e biocompatibilidade com tecidos animais (SURIYAMONGKOL *et al.*, 2007; DJONLAGIC; NIKOLIC, 2011; ALTHURI *et al.*, 2013). Este polímero possui temperatura de fusão (T_m) entre 173 e 180 °C e temperatura de transição vítrea (T_g) entre 4 a 9 °C, apresentando-se com alta cristalinidade, rígido e quebradiço (Djonlagic, 2011). A característica quebradiça do P(3HB) se deve à presença de alta quantidade de domínios cristalinos em forma de esferulitos, formados durante o resfriamento após a etapa de fusão necessária para a confecção de produtos a base do biopolímero (HOBBS *et al.*, 1996; LEE, 1996). Algumas das propriedades mecânicas do P(3HB) são muito similares às do polipropileno, tais como o módulo de Young de 3,5 GPa e resistência a tração de 40 Mpa; porém, sua taxa de alongamento é muito inferior ao polipropileno (RAI; ROY, 2011). Algumas formas de tornar o P(3HB) mais maleável e menos quebradiço sem mudar a composição da molécula já foram avaliadas e caracterizadas por diversos autores. Entre estas formas, as mais promissoras são a formação de blendas com outros polímeros ou a utilização de plastificantes durante o processamento do material (CALVÃO *et al.*, 2010; LIAU *et al.*, 2014; ANBUKARASU *et al.*, 2015).

O P(3HB) possui diversas aplicações como, por exemplo, em matéria-prima para a fabricação de embalagens biodegradáveis (RHIM *et al.*, 2013), na engenharia de tecidos como suporte para o crescimento e diferenciação de células animais (ZONARI *et al.*, 2012), na fabricação de carreadores com liberação controlada de fármacos (LEE *et al.*, 2011; SHRIVASTAV *et al.*, 2013), como suporte para a imobilização enzimática (DEEPAK *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2012; MIRANDA *et al.*, 2014) e na confecção de próteses e implantes (CHEN; WU, 2005; MEDVECKY, 2012).

Apesar de apresentar alta versatilidade e aplicações em processos com alto valor agregado, a produção de P(3HB) possui como principal desvantagem comercial o alto custo de produção quando comparado aos polímeros derivados de petróleo (Choi and Lee, 1999; Shrivastav *et al.*, 2010). Atualmente, o custo de produção é de 5 a 10 vezes superior em comparação ao polietileno ou polipropileno. O alto custo deste biopolímero está atrelado aos métodos de separação e purificação utilizados e às fontes de carbono fornecidas como meio de cultivo, que, devido ao alto valor agregado, podem chegar a 50 % do custo de produção (Tabela 1) (KUMAR; CHAKRABARTI, 2011; RAI; ROY, 2011; MOŽEJKO-CIESIELSKA; KIEWISZ, 2016).

Tabela 1. Empresas produtoras de polihidroxialcanoatos ao redor do mundo e características de produção.

Companhia/País	Organismo	Substrato	Classe de P(3HB) e escala (t/a)	Biomassa (g/L)	P(3HB) (% m/m)
Biomers, Alemanha	<i>Alcaligenes latus</i>	Glucose / Sacarose	P(3HB) (10–300)	>60	>75 %
Biocycles, Brasil	<i>Bacillus spp.</i>	Sacarose	P(3HB) (5)	>90	>50 %
Metabolix, USA	<i>Ralstonia eutropha</i>	Glucose	P(3HB-4HB)	>100	>75 %
Jiang Su Nan Tian, China	<i>Escherichia coli</i>	Glucose	P(3HB) (10)	>150	>80 %

Concentração expressa em percentual da biomassa seca.

Fonte: adaptado de Chen, (2009).

Uma alternativa para tornar este biopolímero economicamente atrativo é através da utilização de substratos de baixo custo, tais como os resíduos agro-industriais que, podem ser oriundos de vários processos produtivos (NATH *et al.*, 2008; KOLLER *et al.*, 2010; BERA *et al.*, 2015). Alguns estudos já demonstram a aplicação de diferentes resíduos e efluentes para a síntese de polihidroxibutirato, desta forma, auxiliando no descarte e agregando valor a estes

materiais e, também, reduzindo os valores na produção de biopolímeros com grande potencial de aplicação no mercado. O uso destes materiais na produção de P(3HB) pode ser exemplificado citando o trabalho de Zhang e colaboradores (2013), que utilizaram o bagaço do fruto de Dendê (*Elaeis guineenses*) hidrolisado e obtiveram 12,48 g/L de biomassa seca contendo 51,5 % de P(3HB) intracelular a partir de *Bacillus megaterium* R11. Cerrone e colaboradores (2015), ao utilizarem o micro-organismo *Burkholderia sacchari* IPT101, obtiveram cultivos de alta densidade celular, com aproximadamente 45 g/L, e concentração intracelular de P(3HB) de 33 %, utilizando chorume proveniente da produção de silagem. Finalmente, Pleissner e colaboradores (2014) utilizaram o hidrolisado enzimático de resíduos provenientes de padarias para cultivar a bactéria *Halomonas boliviensis* e obtiveram biomassa seca de aproximadamente 8 g/L contendo 25 % de P(3HB) intracelular.

Outra estratégia para reduzir o custo de produção deste biopolímero é através da mudança nos sistemas de fermentação e nas etapas de *downstream*. Os métodos de produção em sistemas contínuos possuem algumas vantagens em relação ao sistema de batelada descontínua, como menor tempo ocioso dos equipamentos entre as bateladas e alta produção volumétrica (TAPIA *et al.*, 2016). Como exemplos deste sistema de produção, pode-se citar o trabalho de Yue e colaboradores (2014) com a produção de P(3HB) pela bactéria marinha *Halomonas campaniensis* LS21 e Jena e colaboradores (2015), que avaliaram a produção de P(3HB) em sistema contínuo utilizando um consórcio microbiano em condições anoxigênicas. A produção de P(3HB) através do aproveitamento dos sistemas de tratamento de efluentes por lodos ativados é uma alternativa promissora que vem ganhando destaque nos últimos anos. Neste sistema, o biopolímero é extraído diretamente da biomassa presente no lodo sem a necessidade de gastos com os processos fermentativos, ao mesmo tempo em que ocorre o tratamento dos efluentes (RODGERS; WU, 2010; KUMAR; CHAKRABARTI, 2011; CUI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016).

As etapas de separação e purificação também influenciam o custo de produção do P(3HB) e, desta forma, são alvos para novas pesquisas e desenvolvimentos. Atualmente, as metodologias de extração e purificação do P(3HB) se dividem em: métodos baseados na extração do polímero intracelular por solventes orgânicos e precipitação do polímero em um não-solvente, e em métodos que ocorrem o rompimento celular ou digestão do material celular não composto por P(3HB), com consequente liberação do polímero e posteriores etapas de purificação por solventes (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011; KOLLER *et al.*, 2013). Estas metodologias de recuperação e purificação podem chegar a valores superiores a 90 % de recuperação e pureza; porém, novas estratégias estão continuamente sendo avaliadas

como forma de reduzir o custo, transpor problemas técnicos como o uso de solventes tóxicos ou corrosivos, a geração de efluentes de difícil tratamento para melhorar a qualidade do produto final. Dentre as estratégias de extração e recuperação atualmente estudadas estão o CO₂ supercrítico, a autólise controlada das células, a recuperação do P(3HB) por sistema aquoso de duas fases após rompimento celular e a substituição dos solventes convencionais por solventes considerados amigáveis (HEJAZI *et al.*, 2003; DIVYASHREE *et al.*, 2009; MARTÍNEZ *et al.*, 2011; KOSHRABI-DARANI; MOZAFARI, 2011; KOLLER *et al.*, 2013). Porém, devido aos custos operacionais e outras características técnicas, o uso em escala industrial destas metodologias ainda não é competitivo com as metodologias atualmente empregadas.

1.3 Biossurfactantes e bioemulsificantes

Os biossurfactantes e bioemulsificantes são substâncias anfipáticas (apresentam regiões hidrofóbicas e hidrofílicas em uma mesma molécula). Devido a esta característica, possuem a capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de líquidos, permitir a solubilização de compostos com diferentes polaridades e formar emulsões estáveis (SATPUTE; BANAT; *et al.*, 2010; GUDIÑA *et al.*, 2013). Devido à baixa toxicidade e biodegradabilidade apresentam-se como uma ótima alternativa aos surfactantes e emulsificantes químicos atualmente utilizados em processos industriais (THAVASI, 2013). Estas moléculas apresentam grande potencial de aplicação em diferentes áreas industriais, tais como no auxílio em tratamento de resíduos com alto teor de óleos e graxas, formação de emulsões na indústria alimentícia, na agricultura ou até mesmo em aplicações terapêuticas (BANAT *et al.*, 2010; GUDIÑA *et al.*, 2013; SACHDEV; CAMEOTRA, 2013; SANTOS *et al.*, 2016). Alguns exemplos destas biomoléculas e suas possíveis aplicações são demonstrados a seguir no Quadro 1.

Alguns autores diferenciam os biossurfactantes e bioemulsificantes conforme a composição e propriedades físico-químicas (FRACCHIA *et al.*, 2012; UZOIGWE *et al.*, 2015). De uma forma geral, os biossurfactantes são constituídos de substâncias de baixo peso molecular e podem ser compostos por carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos e outros grupos funcionais (Figura 4a) (DESAI; BANAT, 1997). Como características físico-químicas, os biossurfactantes possuem ótima atividade na redução da tensão superficial e interfacial entre duas fases (líquido/ar, líquido/líquido e líquido/sólido), baixa concentração micelar

crítica e formação de emulsões estáveis (SATPUTE; BANPURKAR; *et al.*, 2010). Diferentemente, os bioemulsificantes são moléculas de alto peso molecular podendo ser compostos por heteropolissacarídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas, proteínas e em alguns casos complexos entre um ou mais destes compostos (Figura 4b) (RON; ROSENBERG, 2001; SMYTH *et al.*, 2010). Em relação às propriedades físico-químicas, os bioemulsificantes, assim como os biossurfactantes, possuem a capacidade de emulsificar líquidos imiscíveis mesmo quando presentes em baixas concentrações, porém possuem inferior atividade na redução da tensão superficial (UZOIGWE *et al.*, 2015).

Quadro 1. Exemplos de biossurfactantes e bioemulsificantes, micro-organismos produtores e possíveis aplicações

	Classe	Origem Microbiana	Aplicações	Referência
Biossurfactantes	Ramnolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DS10-129	Biorremediação	Rahman <i>et al.</i> , (2002)
	Trealoselipídeo	<i>Nocardia farcinica</i> BN26	Atividade Antitumoral	Christova <i>et al.</i> , (2015)
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Recuperação de óleo Antibacteriano	Ongena e Jacques, (2008)
		<i>Bacillus siamensis</i>	Antitumoral Anticoagulante	Pathak e Keharia, (2014)
	Fengicina	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Fungicida Atividade Imunomodulatória	Arrebola <i>et al.</i> , (2010) Pathak e Keharia, (2014)
Bioemulsificante	Manoproteína	<i>Candida albicans</i>	Emulsões estáveis Estimulação do sistema imune	Casanova <i>et al.</i> , (1992) Lukondeh <i>et al.</i> , (2003)
		<i>Kluyveromyces marxianus</i>		
	Expolissacarídeo rico em ácido urônico	<i>Halomonas eurihalina</i> <i>Klebsiella</i> sp.	Emulsificação e destoxificação	Martinez-Checa <i>et al.</i> , (2002) Jain <i>et al.</i> , (2013)

Fonte: adaptado de Uzoigwe *et al.*, (2015)

A síntese dos biossurfactantes e bioemulsificantes pode ser realizada por uma ampla classe de micro-organismos como bactérias, leveduras e alguns fungos filamentosos (NERURKAR *et al.*, 2009). Embora as funções fisiológicas destas substâncias não sejam completamente esclarecidas, admite-se que a principal função dos biossurfactantes e bioemulsificantes está relacionada com a emulsificação e solubilização de substratos hidrofóbicos em água (SANTOS *et al.*, 2016). Porém, alguns estudos indicam que estas substâncias podem estar envolvidas na atividade antimicrobiana, patogenicidade, adesão celular, formação de biofilmes e no *quorum-sensing* de vários organismos (Ibacache-Quiroga

et al., 2013; Kim *et al.*, 2014; Ron e Rosenberg, 2001). A produção dos biossurfactantes e bioemulsificantes pode ser influenciada por diversos fatores de caráter nutricional e ambiental. A composição, concentração e a atividade destas moléculas não dependem apenas da espécie do organismo analisado, mas também, da fonte de carbono e nitrogênio fornecida, limitações nutricionais, relação carbono/nitrogênio, aeração, pH e temperatura de cultivo (TOLEDO *et al.*, 2008; FAKRUDDIN, 2012; SANTOS *et al.*, 2016).

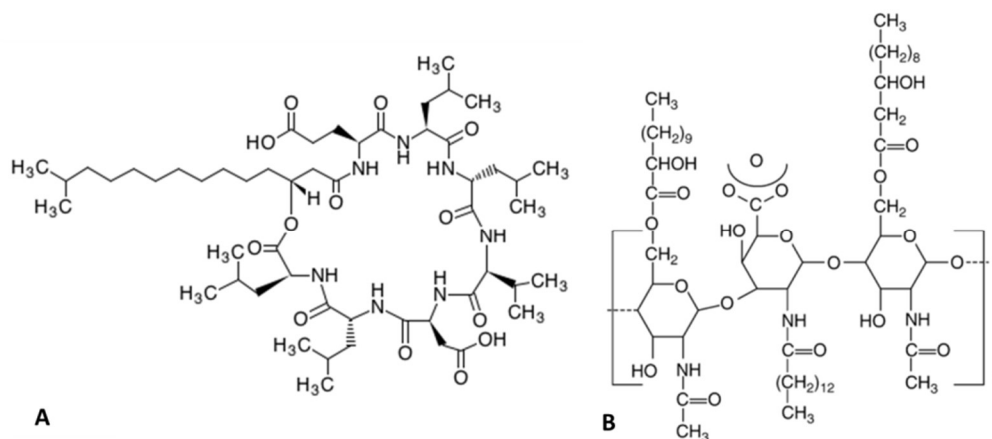


Figura 4. Exemplo de estruturas químicas dos biossurfactantes e bioemulsificantes. Biossurfactante surfactina produzido por *B. subtilis* (A) e o bioemulsificante emulsan produzido por *Acinetobacter* RAG-1 (B). Fonte: adaptado de Smyth *et al.*, (2010); Li *et al.*, (2015).

Apesar da diversidade de aplicações já relatadas para os biossurfactantes e bioemulsificantes, a produção em escala industrial destas moléculas ainda se mostra um desafio devido ao alto custo de produção quando comparado aos surfactantes e emulsificantes sintéticos (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.*, 2011; THAVASI, 2013). Dentre os fatores que tornam estes processos economicamente inviáveis estão às baixas concentrações obtidas durante os processos fermentativos, o alto custo dos processos de *downstream* e o custo da fonte de nutrientes (MUKHERJEE *et al.*, 2006; FRACCHIA *et al.*, 2012; BANAT *et al.*, 2014). Desta forma, a busca por novas estratégias de produção ou organismos que possuam a capacidade de produzir estas biomoléculas em maiores quantidades são os principais focos de estudos atualmente.

O uso de substratos alternativos de origem renovável tem sido amplamente estudado como forma de reduzir o custo de produção. Dentre estas matérias-primas os resíduos agroindustriais, por exemplo, o soro de leite, melaço de cana-de-açúcar e os óleos residuais possuem grande potencial de aplicação nesta área (MAKKAR *et al.*, 2011). O uso desses resíduos para a produção de biossurfactantes ou bioemulsificantes pode ser exemplificada pelos trabalhos realizados por Gudina e colaboradores (2015), que avaliaram a produção de

surfactina pela bactéria *B. subtilis* utilizando milhocina como única fonte de nutrientes, a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* utilizando óleo residual de fritura relatado por George e Jayachandran, (2013) e a produção de polissacarídeo e surfactina por *B. subtilis* ATCC 6633 utilizando soro de leite como meio fermentativo (CAGRI-MEHMETOGLU *et al.*, 2012). A mudança no sistema produtivo com a utilização de fermentação em estado sólido ao invés de fermentação submersa é uma alternativa para a redução nos custos de produção, uma vez que podem ser utilizados resíduos sólidos com alto potencial nutritivo, além de melhorar características do processo, como a redução da formação de espuma durante a fermentação (KRIEGER *et al.*, 2010; CAMILIOS-NETO *et al.*, 2011; GHRIBI *et al.*, 2012; KIRAN; NISHANTH; *et al.*, 2014).

Outra forma de reduzir o custo de produção destas biomoléculas é através da modificação nas estratégias de separação e purificação. Uma das alternativas é através da substituição dos solventes orgânicos convencionais, tais como o clorofórmio, acetona e metanol por solventes mais baratos e ambientalmente corretos, como o éter metil terciário butílico (MTBE) (MUKHERJEE *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2016). O fracionamento em coluna de bolhas é outra estratégia de recuperação destas biomoléculas que vem ganhando atenção devido ao reduzido custo e facilidade de operação. Esta metodologia possui como princípio de funcionamento a formação de espuma através da pressurização de um gás inerte ao líquido fermentado e conseqüentemente o deslocamento da substância alvo do líquido para a camada de espuma (WINTERBURN *et al.*, 2011; KÜGLER *et al.*, 2015; BEUKER *et al.*, 2016).

1.4 Enzimas hidrolíticas

Muitos dos processos químicos utilizados nas diferentes áreas industriais possuem problemas comerciais e ambientais, tais como: baixos rendimentos dos produtos devido à inespecificidade das reações, alto custo energético com etapas que requerem altas temperaturas ou pressões, uso de solventes tóxicos e a formação de subprodutos de difícil recuperação e tratamento. Desta forma, a substituição dos métodos produtivos convencionais por métodos enzimáticos torna-se cada vez mais promissora, já que permite contornar problemas e dificuldades encontradas nas indústrias (GURUNG *et al.*, 2013; JESIONOWSKI *et al.*, 2014; PARAGES *et al.*, 2016).

As enzimas são biocatalisadores que possuem como principal função acelerar as

reações bioquímicas presentes em organismos vivos, contudo, estas biomoléculas podem ser extraídas das células e utilizadas em uma ampla gama de processos industriais. Atualmente, mais de 500 produtos são obtidos utilizando estes biocatalisadores e mais de 150 processos são beneficiados através da utilização de enzimas microbianas (DALMASO *et al.*, 2015). Estas biomoléculas possuem grande importância econômica e podem ser aplicadas em diferentes setores indústrias, tais como nas indústrias têxtil, alimentícia, farmacêutica e pecuária (Quadro 2) (GURUNG *et al.*, 2013; ROBINSON, 2015).

Quadro 2. Aplicações industriais de enzimas microbianas

Setor	Enzima	Função	Micro-organismo
Bebidas	Pectinase	Redução da viscosidade	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Penicillium funiculosum</i>
	β -amilase	Hidrólise do amido	<i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Rhizopus</i>
	Protease	Clarificação	<i>Aspergillus niger</i>
	Celulase	Liquefação de frutas	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma atroviride</i>
Laticínios	Protease ácida	Coagulação do leite	<i>Aspergillus sp</i>
	Lipase	Maturação de queijos	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i>
	β -galactosidase	Redução da lactose	<i>Escherichia coli</i> , <i>Kluyveromyces sp.</i>
Detergentes	Amilase	Remoção de carboidratos	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
	Lipase	Remoção de lipídios	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. flavu</i>
	Protease	Remoção de proteínas	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
Cosméticos	Lacase	Tinturas para cabelo	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Trametes versicolor</i>
	Superóxido dismutase	Proteção contra radicais livres	<i>Corynebacterium</i>
Farmacêutica	Colagenase	Tratamento de ulcera epidérmica	<i>C. perfringens</i>
	Uricase	Tratamento de artrite	<i>A. flavu</i>
	Estreptoquinase	Coagulação sanguínea	<i>Streptococci sp.</i>
	Glutaminase	Tratamento da leucemia	<i>E. coli</i> SFL-1
Pecuária	Fitase	Hidrolise do ácido fítico, liberação de fósforo	<i>Aspergillus niger</i>
	Xilanase	Aumentar a digestibilidade do amido	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Bacillus sp.</i>

Fonte: adaptado de Gurung *et al.*, (2013) e Singh *et al.*, (2016).

As enzimas hidrolíticas representam uma grande parcela das enzimas comercializadas atualmente, sendo consideradas produtos de alto valor agregado, que podem ser obtidas de diferentes organismos, por exemplo, bactérias, fungos e plantas (SINGH *et al.*, 2016). Aproximadamente 75 % de todas as enzimas industriais são pertencentes à classe das

hidrolases, sendo as carboidrases, proteases e lipases as que apresentam maior representatividade, com mais de 70 % de todas as enzimas comercializadas (LI *et al.*, 2012). As enzimas correspondem a uma grande parcela do mercado de produtos de origem biotecnológica que, no ano de 2013, foi avaliada em aproximadamente \$4,8 bilhões, com estimativa de crescimento anual de 8,2 %, com expectativa de chegar a aproximadamente \$7,1 bilhões em 2018 (DEWAN, 2014). Dentre as enzimas hidrolíticas, as proteases são as principais enzimas comercializadas devido ao seu extensivo uso na indústria de detergentes e de alimentos (GURUNG *et al.*, 2013).

A busca por enzimas com propriedades diferenciadas ou melhoria nas características das já existentes é importante devido ao surgimento de novos produtos e processos produtivos ao longo do tempo. Além disto, fatores como baixa estabilidade térmica, redução da atividade com a variação do pH e a perda da atividade catalítica após algum tempo de uso são outros fatores que incentivam esta busca (JESIONOWSKI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2012).

Como forma de contornar alguns dos problemas relacionados à aplicação das enzimas em processos industriais, diferentes autores sugerem a imobilização enzimática, uma vez que esta auxilia na recuperação das enzimas e, em alguns casos, pode melhorar a atividade catalítica, ampliando as possibilidades de aplicação (DICOSIMO *et al.*, 2013; GRAY *et al.*, 2013; MOHAMAD *et al.*, 2015). Outra estratégia amplamente aplicada é a prospecção de novas enzimas com propriedades superiores as já utilizadas. Esta estratégia pode estar correlacionada com ambientes que apresentam condições extremas de sobrevivência para os micro-organismos (DALMASO *et al.*, 2015). Os ambientes marinhos são uma fonte promissora de novas biomoléculas devido às pressões ambientais exercidas sobre os organismos, e vários autores relataram a obtenção de enzimas de interesse industrial com micro-organismos oriundos destes locais (ZHANG; KIM, 2010; D'ORAZIO *et al.*, 2012; LITTLECHILD, 2015). Como exemplo destas biomoléculas pode-se citar: a lipase termoestável e halotolerante produzida pela bactéria *Oceanobacillus* sp. PUMB02 descrita por Seghal Kiran e colaboradores (2014), a produção da protease alcalina sintetizada pela bactéria marinha *Pseudomonas hibiscicola* (CUI *et al.*, 2015) e a enzima multifuncional Amy63, produzida por *Vibrio alginolyticus*, que apresenta atividade hidrolíticas sobre os substratos amido, ágar-ágar e carragenana (LIU *et al.*, 2015).

1.5 O gênero *Halomonas* como produtor de biomoléculas

A família *Halomonadaceae* é pertencente à classe das *Gamaproteobactérias* e possui o maior número de bactérias halofílicas e halotolerantes descritas até o momento (GAO *et al.*, 2015). De acordo com o banco de dados *List of prokaryotic names with standing in nomenclature* (LPSN) (PARTE, 2014), esta família possui treze diferentes gêneros, dentre eles, o gênero *Halomonas*, que é o maior representante da família em número de espécies catalogadas. Até o momento da realização deste manuscrito, foram descritas aproximadamente 90 espécies de bactérias pertencentes a este gênero isoladas de diferentes habitats (PARTE, 2014). Estes micro-organismos estão normalmente associados a ambientes marinhos e/ou salinos e podem ser encontrados em diferentes locais geográficos ao redor do mundo (DOU *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2014; KAYE *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2007b; MNIF *et al.*, 2009; QU *et al.*, 2011; QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2004).

O gênero *Halomonas* compreende bactérias Gram-negativas, móveis e em forma de bastonetes. Estes organismos possuem a capacidade de se desenvolverem em concentrações salinas entre 0 e 30 % e pH e temperatura variando entre 5 a 12 e 0 a 45 °C, respectivamente (QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2007; QU *et al.*, 2011). Estas bactérias apresentam grande potencial para a aplicação em processos industriais, uma vez que possuem resistência a condições extremas como a pressão osmótica, e também à diversidade de metabólitos com interesse industriais produzidos durante o seu desenvolvimento (KAWATA *et al.*, 2016; CAI *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2011; YUE *et al.*, 2014).

Micro-organismos do gênero *Halomonas* possuem a capacidade de produzir diferentes classes de biomoléculas de interesse industrial, sendo os PHAs e os biossurfactantes as duas principais moléculas associadas a estes micro-organismos. A produção de PHAs por bactérias deste gênero é relatada por vários autores com a utilização de diferentes fontes de nutrientes e sistemas fermentativos. Estes sistemas podem variar desde fermentações descontínuas até produção em sistemas contínuos (QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2010). Devido à tolerância a altas concentrações salinas por parte destes micro-organismos, os estudos em produção de PHAs em sistemas abertos e não esterilizados vem ganhando destaque nos últimos anos. Neste método de produção leva-se em consideração a inibição dos micro-organismos que podem contaminar o sistema devido ao aumento do potencial osmótico do *meio* de cultivo (TAN *et al.*, 2011; KAWATA *et al.*, 2013; YUE *et al.*, 2014). Outra vantagem na utilização destes micro-organismos está relacionada com a capacidade que possuem em converter diferentes fontes de carbono em PHAs, característica que permite o uso de um amplo espectro

de substratos, incluindo os resíduos agroindustriais (Tabela 2).

Os biossurfactantes/bioemulsificantes podem ser produzidos por diferentes espécies de bactérias do gênero *Halomonas*, sendo que a natureza destas biomoléculas podem variar desde glicoproteínas a exopolissacarídeos (Quadro 3). As moléculas produzidas por estes micro-organismos apresentam boas características, como alta atividade emulsificante e estabilidade em uma ampla faixa de temperatura e pH (SATPUTE; BANAT; *et al.*, 2010). Estudos demonstram que estas moléculas podem ser aplicadas para várias finalidades, tendo como principal função a aplicação como coadjuvantes na remoção de óleos em passivos ambientais. Uma das vantagens na produção destas biomoléculas por organismos pertencentes a este gênero é a possibilidade de aplicação *in situ* do organismo como forma de remediação em derramamento de derivados de petróleo em ambientes que apresentam alta concentração salina (DHASAYAN *et al.*, 2014). Aplicações com maior valor agregado destas moléculas como, por exemplo, antimicrobianos já foram relatadas na literatura (DONIO *et al.*, 2013; VELMURUGAN *et al.*, 2013).

Tabela 2. Produção de poli(3-hidroxibutirato) por micro-organismos do gênero *Halomonas* utilizando diferentes fontes de carbono.

Espécie/Linhagem	Fonte de carbono	Biomassa (g/L)	P(3HB) % (m/m)	Referência
<i>H. boliviensis</i> LC1	Sacarose	14,4	54	Quillaguamán <i>et al.</i> , (2007)
<i>H. hydrothermalis</i>	Resíduo da produção de biodiesel	4,03	75,8	Shrivastav <i>et al.</i> , (2010)
<i>Halomonas</i> sp. KM-1	Hidrolisado hemicelulósico	26,3	50	Kawata <i>et al.</i> , (2013)
<i>H. campaniensis</i> LS21	Substrato misto composto por celulose, lipídio e amido	70	30	Yue <i>et al.</i> , (2014)
<i>H. boliviensis</i>	Amido hidrolisado e xilose	8,3	45	Rivera-Terceros <i>et al.</i> , (2015)

Outra importante classe de biomoléculas com interesse econômico são as enzimas hidrolíticas que, assim como os PHAs e os biossurfactantes, podem ser obtidas a partir do gênero *Halomonas* (DALMASO *et al.*, 2015). Estes organismos são capazes de produzir diferentes classes de enzimas com características favoráveis para a aplicação em processos industriais (KUMAR *et al.*, 2012; LOURDES MORENO, DE *et al.*, 2013). A produção destas enzimas pode ser exemplificada pelo trabalho desenvolvido por Yue e colaboradores (2014), que identificaram a produção de amilase, lipase, protease e celulase em *H. campaniensis* LS21 durante a produção de PHAs em sistema contínuo. Pela identificação das enzimas

amilase, lipase, protease, xilanase, pululanase, pectinase e celulase em diferentes linhagens de *Halomonas* isoladas de amostras do lago hipersalino, Howz Soltan, Iran (ROHBAN *et al.*, 2009). Dang e colaboradores (2009) identificaram a produção de amilases, proteases, lipases e DNases em diversas linhagens de bactérias do gênero *Halomonas* isoladas de sedimentos oceânicos. Neste trabalho, os autores observaram a produção destas enzimas em diferentes condições de temperatura e pH, demonstrando que estes organismos possuem potencial para a produção de enzimas mesmo em baixas temperaturas.

Quadro 3. Produção de biossurfactantes/bioemulsificantes por micro-organismos do gênero *Halomonas*.

Micro-organismo	Classe	Estudo de aplicações	Fonte de carbono	Referência
<i>H. eurihalina</i>	Exopolissacarídeo	Emulsificação de hidrocarbonetos	Sintético/Glucose	Martinez-Checa <i>et al.</i> , (2007)
<i>Halomonas</i> sp. C2SS100	-----	Auxílio na degradação de óleo	Sintético/Óleo Cru	Mnif <i>et al.</i> , (2009)
<i>Halomonas</i> sp. BS4	Glicolípido, Substâncias Poliméricas e Lipopeptídios	Antimicrobiano Antitumoral	Caldo Nutriente	Donio <i>et al.</i> , (2013)
<i>Halomonas</i> sp. MB-30	Glicolípido	Recuperação de óleo	Sintético/Glucose	Dhasayan <i>et al.</i> , (2014)
<i>Halomonas</i> sp.	Glicoproteína	Emulsificação de óleo vegetal	Sintético/Glucose	Gutiérrez <i>et al.</i> , (2007)

Além das moléculas anteriormente citadas, outras substâncias de interesse industrial podem ser obtidas a partir de micro-organismos do gênero *Halomonas*, tais como o piruvato, utilizado como precursor na síntese de fármacos, polímeros, cosméticos e aditivos na indústria alimentícia (LI *et al.*, 2001; KAWATA *et al.*, 2016). Pode ser obtido também biofloculante, produzido a partir do consórcio entre *Halomonas* sp. Okoh e *Micrococcus* sp. Leo com aplicação em tratamento de águas e efluentes (OKAIYETO *et al.*, 2013) e, por último, sideróforos produzidos em condições de limitação de ferro. Estas biomoléculas podem ser aplicadas em diversas áreas, tais como na agricultura como promotores de crescimento vegetal e agentes contra fitopatógenos ou na área da saúde através do combate a bactérias resistentes a antibióticos pelo transporte seletivo de antibióticos através da estratégia conhecida como “Trojan horse strategy” (HOMANN *et al.*, 2009; CARVALHO, DE; FERNANDES, 2014; SAHA *et al.*, 2016).

Apesar dos diversos estudos envolvendo a produção de biomoléculas a partir do

gênero *Halomonas*, poucas informações são relatadas para a espécie *H. hydrothermalis*, objeto do presente trabalho. Dentre estas informações, estão o isolamento e caracterização da linhagem Slthf² por Kaye e colaboradores (2004) e o isolamento e identificação de outras três linhagens provenientes de ambiente salino (DANG *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2006; SHRIVASTAV *et al.*, 2010). Em relação à aplicação, estão descritos apenas dois trabalhos utilizando o organismo *H. hydrothermalis* MTCC 5445, com a avaliação da produção de polihidroxialcanoato, utilizando glicerol proveniente da produção de biodiesel (SHRIVASTAV *et al.*, 2010) e o ácido levulínico obtido a partir da hidrólise ácida de κ -carragenana de *Kappaphycus alvarezii* como co-nutriente (BERA *et al.*, 2015). Conforme o exposto, pode-se perceber o potencial biotecnológico para esta espécie e a necessidade de maiores informações em relação às biomoléculas produzidas e suas aplicações.

1.6 Resíduos provenientes de hortifrutigranjeiros em centrais de abastecimento

Durante a cadeia produtiva de frutas e vegetais destinados ao consumo humano, é observada a perda e desperdício de parcela da produção durante as etapas de plantio e pós-colheita. As perdas pós-colheita podem ser definidas como aquelas decorrentes da não comercialização e consumo destes alimentos. Estas perdas são resultantes da soma dos danos causados aos alimentos nas etapas de pós-colheita, transporte, armazenamento, processamento e comercialização (CHITARRA; CHITARRA, 2005). Os efeitos fisiológicos, como alto teor de umidade, nutrientes e continuidade do metabolismo após a colheita, possuem grande papel na perda da qualidade destes materiais, contudo os efeitos externos como acondicionamento, manipulação e transporte inapropriados possuem efeito fundamental para o aumento do descarte destes alimentos. Além destes fatores, o padrão de qualidade estabelecido pelos comerciantes e consumidores leva ao descarte de frutas e verduras que possuem ainda características apropriadas para o consumo (WILLERSINN *et al.*, 2015).

A perda e desperdício de alimentos em países industrializados é mais expressiva em comparação aos países em desenvolvimento. Estima-se que nos países em desenvolvimento mais de 40% dos alimentos desperdiçados enquadram-se nas etapas de pós-colheita até a distribuição, enquanto nos países desenvolvidos as perdas estão atreladas ao desperdício dos consumidores (FAO, 2011). Segundo dados publicados pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (2011) na América Latina, a perda e desperdício *per capita* de alimentos ultrapassa os 200 kg ao ano, com aproximadamente 90% nas etapas que envolvem a

produção e comercialização do alimento.

No Brasil, a distribuição e comercialização de hortifrutigranjeiros são realizadas em grande parte através das Centrais de Abastecimento (CEASA) distribuídas em diversas cidades do país. No estado do Paraná, a CEASA possui cinco unidades distribuídas nos municípios de Foz do Iguaçu, Cascavel, Maringá, Londrina e Curitiba. Dentre os resíduos gerados nestes locais, encontram-se os resíduos orgânicos compostos por frutas, verduras e legumes decorrentes da não comercialização devido à qualidade fora dos padrões exigidos ou por oscilações no valor do produto. Atualmente, os resíduos orgânicos gerados nas CEASAS são descartados em compactadores para facilitar o transporte e destinados aos aterros sanitários, centros de compostagem ou doados aos criadores de animais. A quantidade de material orgânico gerado e destinado aos aterros sanitários ou centros de compostagem varia conforme a central de abastecimento, sendo a unidade de Curitiba a que possui maior produção (Tabela 3).

Tabela 3. Quantidade de resíduos orgânicos gerados nas centrais de abastecimento do Paraná.

Unidades	Produtos hortifrutigranjeiros depositados em aterros sanitários (em kg)	Produtos hortifrutigranjeiros para compostagem (em kg)	Produtos hortifrutigranjeiros doados a criadores de animais (em kg)
Curitiba	712.112	257.565	0
Cascavel	102.555	0	0
Foz do Iguaçu	4.787	67.754	2.808
Londrina	123.365	0	17.228
Maringá	95.441	0	0

Valores referentes à média mensal no ano de 2012. Fonte: Plano de gerenciamento de resíduos sólidos. Brasil, (2012).

No ano de 2011, a empresa OrganoBem em conjunto com o governo do Estado do Paraná, desenvolveu um sistema para a produção de ração animal a partir destes rejeitos orgânicos (BRASIL, 2011). Porém, atualmente, este resíduo está sendo tratado pela empresa Estre Ambiental S.A. e durante a compactação para o transporte ocorre a geração de uma fração líquida (efluente) que corresponde a aproximadamente 80 % dos rejeitos sólidos tratados e que não possui destino correto. A utilização deste efluente como matéria-prima em processos fermentativos para a obtenção de biomoléculas ou outros produtos de interesse não é descrita na literatura até o momento da elaboração deste manuscrito. Entretanto, a aplicação deste material em bioprocessos mostra-se muito promissora devido às características químicas, alta disponibilidade e baixo custo para obtenção em relação aos substratos comerciais.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o potencial biotecnológico da bactéria marinha *Halomonas hydrothermalis* para a produção de bioplástico poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) e co-produtos a partir de efluente hortifrutigranjeiro.

Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente o efluente proveniente da prensagem de hortifrutigranjeiros do CEASA/PR unidade Curitiba;
- Avaliar o crescimento e produção de P(3HB) de um micro-organismo isolado em ambiente marinho utilizando o efluente originário do CEASA/PR;
- Extrair e caracterizar o P(3HB) produzido pelo micro-organismo;
- Avaliar o tratamento prévio do efluente para eliminação da microbiota nativa;
- Otimizar o processo de produção de P(3HB) por meio do delineamento composto central rotacional;
- Avaliar a produção de biossurfactante e de enzimas hidrolíticas pelo micro-organismo de estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento, identificação e manutenção do micro-organismo

A bactéria utilizada neste trabalho foi fornecida na forma de cultura pura pelo laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade do Vale do Itajaí (Itajaí - SC, Brasil). O micro-organismo foi isolado de uma amostra de água coletada a 10 m de profundidade na cordilheira meso-oceânica do Atlântico Sul (Elevação do Rio Grande) através do projeto *South Atlantic Mar-Eco – Patterns and Processes of the Ecosystems of the Shouthern Mid-Atlantic*. O isolamento e identificação foram realizados pelo laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade do Vale do Itajaí conforme descrito por da Silva e colaboradores (2013). De forma breve, a amostra de água marinha foi diluída seriadamente de 10^{-1} até 10^{-5} com água marinha esterilizada por filtração ($0,22\ \mu\text{m}$); em seguida, as amostras diluídas foram inoculadas nos meios de cultivo ágar marinho (Himedia, M384) suplementado com Tween 40 e ágar marinho (Himedia, M384) suplementado com carboximetilcelulose. Após três semanas de incubação a $10\ ^\circ\text{C}$, as colônias de diferentes morfologias foram selecionadas e transferidas para novos meios diversas vezes. Dentre os diferentes micro-organismos isolados, a cepa denominada de LAMA 685 apresentou capacidade de produzir P(3HB) e foi selecionada para o desenvolvimento deste trabalho.

Para a identificação do micro-organismo, o DNA genômico foi extraído de uma cultura crescida em meio caldo marinho (Himedia, M385) a 30°C com o kit de extração *Real Genomics*. A sequência do RNA ribossomal 16S foi amplificada utilizando os primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Os produtos de amplificação do rRNA foram purificados e sequenciados (MACROGEN, Seoul-Korea) utilizando o sequenciador automatizado ABI 3100 com o kit BigDye Terminator (Applied Biosystems). A sequência obtida foi editada com o software Vector NTI Suite 9 e comparada no NCBI contra um banco de dados não redundante. As unidades operacionais taxionômicas (UOT) foram definidas com similaridade de 97 % e a árvore filogenética foi construída utilizando o software Mega5, utilizando o método Neighbor-Joining, com as sequências alinhadas pelo Software Muscle. A sequência do rRNA 16S obtida foi depositada no GenBank (NCBI) sob número de acesso KY7710954. Após estas etapas, o micro-organismo foi identificado como sendo pertencente à espécie *Halomonas hydrothermalis* e denominado como linhagem LAMA 685.

A manutenção do micro-organismo foi realizada através do crescimento das células em meio de cultivo líquido Luria Bertani (Himedia, M1245) por 18 h a 30 °C e 160 rpm e em seguida decantadas por centrifugação a 10000 x g por 5 min. O pellet de células foi ressuspensionado em solução de glicerol a 50 % (v/v), esterilizada e acondicionada a -80 °C.

3.2 Efeito da temperatura, pH e concentração de NaCl no crescimento celular

Os efeitos da temperatura, pH e concentração de NaCl no crescimento celular foram avaliados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de caldo Luria Bertani com modificações na composição quando necessário. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os meios inoculados com 4 % (v/v) de uma pré-cultura obtida a 30°C e 160 rpm até densidade óptica em 600 nm de 1,2 ($\pm 0,1$). O efeito da temperatura no crescimento celular foi avaliado nas temperaturas de 10, 20, 30 e 40 °C com agitação de 160 rpm por um período de 24 h. A medida do crescimento celular foi obtida através da densidade óptica do cultivo em 600 nm. A avaliação do crescimento em diferentes valores de pH foi realizada em meio LB com pH modificado para 6, 7, 8 e 9; o cultivo foi realizado a 30 °C e 160 rpm. O crescimento celular foi medido através da densidade óptica e avaliado pela comparação dos valores obtidos durante a fase logarítmica.

O efeito da concentração salina foi avaliado utilizando concentrações de NaCl variando de 0 a 70 g/L e o crescimento celular medido com base na biomassa seca obtida após 24 h de cultivo. Para tanto, o volume total de cultivo contido em cada frasco Erlenmeyer foi centrifugado a 4300 x g por 5 min a 10 °C e as células lavadas duas vezes com solução salina 0,9 % (m/v). Em seguida, os pellets obtidos foram secos por liofilização até peso constante.

3.3 Análise do crescimento celular em diferentes fontes de carbono

O efeito das diferentes fontes de carbono no crescimento celular foi avaliado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio mínimo M9 modificado, composto por litro: Na₂HPO₄.2H₂O (6,0 g), KH₂PO₄ (3,0 g), NaCl (0,5 g), NH₄Cl (1,0 g), MgSO₄ (0,24 g) e CaCl₂ (0,011g). O meio foi suplementado com 1 % (v/v) de solução de elementos-traço contendo por litro: EDTA (5,0 g), FeCl₃.6H₂O (0,83 g), ZnCl₂ (0,084 g), CuCl₂.2H₂O (0,013 g), CoCl₂.2H₂O (0,01 g), H₃BO₃ (0,010 g) e MnCl₂.4H₂O (0,0016 g). As fontes de carbono frutose, glucose, lactose, maltose, manose, sacarose e xilose foram esterilizadas por filtração

(0,22 μm) e adicionadas ao meio de cultivo, separadamente, de forma que o meio possuísse 0,8 g/L de carbono. Todos os experimentos foram realizados em triplicata utilizando 4 % (v/v) de inoculo produzido em meio M9 a 30 °C e 160 rpm até DO_{600} de 1,2 ($\pm 0,1$). O crescimento celular nas diferentes fontes de carbono foi realizado a 30 °C e 160 rpm por 24 h e mensurado através da DO_{600} .

3.4 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas por *Halomonas hydrothermalis*

A capacidade da bactéria *H. hydrothermalis* em produzir enzimas hidrolíticas foi avaliada conforme descrito por Gopinath e colaboradores (2013), Yue e colaboradores (2014) e Uzyol e colaboradores (2012) com modificações quando necessário. Para tanto, a análise foi realizada em meio sólido composto por (g/L): extrato de levedura (5,0), CaCl_2 (1,0) e ágar bacteriológico (15,0). Os meios foram individualmente suplementados com 5 g/L de: gelatina, amido solúvel, Tween 20, carboximetilcelulose e pectina de maçã para a avaliação da atividade das enzimas protease, amilase, lipase, celulase e pectinase, respectivamente. O micro-organismo foi inoculado nos meios de cultivo a partir de uma solução estoque através da técnica de esgotamento por estria e incubado a 30 °C por 72 h. Em seguida, a atividade enzimática foi revelada pela formação dos halos de degradação através da coloração com: solução de Lugol (I_2 1 % e KI 2 % em água destilada) para a atividade de amilases e pectinases; solução de vermelho do Congo a 0,23 % (m/v) em água destilada e descoloração com solução salina a 23 % (m/v) para celulase; solução de azul brilhante de Coomassie G-250 0,25 % (m/v) solubilizado em metanol:ácido acético:água (5:1:4), seguido da descoloração com solução de metanol:ácido acético:água (5:1:4) para proteases; para a atividade lipolítica foi avaliada a deposição de cristais de cálcio formados pela liberação de ácidos graxos durante a hidrólise do Tween 20 .

3.5 Coleta do efluente de hortifrutigranjeiros, estoque e caracterização dos principais componentes

O efluente foi coletado em frascos de polipropileno com volume de 5 L diretamente dos compactadores localizados na Central de Abastecimento do Paraná na unidade Curitiba (Figura 5). O material coletado foi acondicionado em caixas térmicas com gelo durante o transporte até o laboratório. Devido à alta concentração de sólidos suspensos, o efluente foi

filtrado em tecido de poliéster e congelado a -80°C . Após congelamento, os recipientes contendo o efluente filtrado foram acondicionados em freezer a -20°C (Figura 6).



Figura 5. Localização dos compactadores presentes na central de abastecimento do Paraná na unidade Curitiba. Fonte: Google Maps.

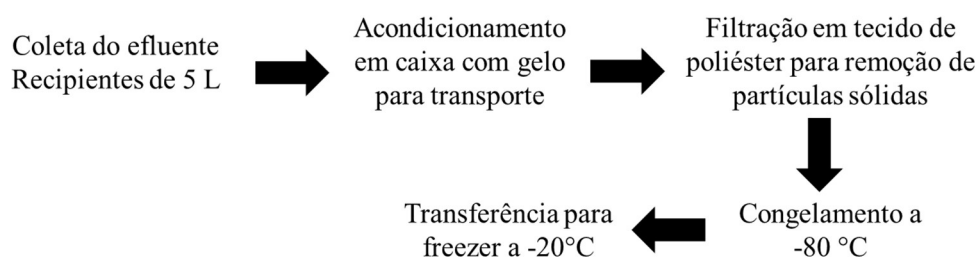


Figura 6. Fluxograma da coleta e processamento do efluente hortifrutigranjeiro proveniente da central de abastecimento do Paraná.

A identificação dos principais componentes presentes no efluente foi realizada por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C em espectrômetro modelo DRX 400 Avance series (Bruker, USA). A caracterização dos carboidratos simples solúveis majoritários foi realizada através da cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel 60805 (Sigma-Aldrich, Germany), com fase móvel composta por acetato de etila:ácido acético:n-propanol:água (4:2:2:1). A revelação dos spots foi realizada pelo método orcinol/ácido sulfúrico (STAHL, 1969). Os monossacarídeos foram quantificados pela técnica de cromatografia líquida de troca aniônica de alto desempenho acoplada a detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD) no cromatógrafo ICS-5000 (Thermo Scientific Dionex, USA) equipado com a coluna CarboPac PA20. A relação carbono/nitrogênio foi avaliada pelo

método de Pregl-Dumas, através da combustão da amostra em atmosfera de oxigênio puro utilizando o analisador elementar CHN Perkin Elmer 2400 Series II. A demanda química de oxigênio (DQO) e pH foram determinados de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1998). A concentração de lipídios totais foi determinada gravimetricamente após a extração pela técnica descrita por Bligh and Dyer (1959). Os íons nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) e fosfato (PO_4^{3-}) foram quantificados por cromatografia iônica de alta pressão (High-Pressure IC) em cromatógrafo Thermo Scientific ICS 5000/ICS 1100 (Thermo Scientific Dionex, USA) equipado com a coluna IonPac AS19. As determinações das concentrações de nitrogênio amoniacal Kjeldahl e do ácido cítrico (Acidez Total Titulável) foram realizadas de acordo com o Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres (BRASIL, 2013). Os valores dos sólidos solúveis (°Brix) foi determinado em refratômetro portátil *Master Refractometer* (Atago, Master-53a).

3.6 Quantificação da biomassa seca e poli(3-hidroxibutirato) por gravimetria

A quantificação da biomassa e do P(3HB) por gravimetria foi realizada coletando as células por centrifugação a 4300 x g a 10 °C por 5 min em tubo de fundo cônico previamente seco a 60 °C por 24 h e com massa conhecida. Em seguida, o pellet de células foi congelado a -80 °C e seco por liofilização até peso constante. A quantificação do P(3HB) foi realizada após a extração dos grânulos intracelulares conforme descrito por Law and Slepecky (1961) com modificações. De forma breve, o material celular não composto por P(3HB) foi digerido com solução de hipoclorito de sódio a 5 % (v/v) a 45 °C por 45 min utilizando a proporção de 100 mL de solução digestora para cada grama de células obtidas. Em seguida, os grânulos foram decantados por centrifugação a 4300 x g por 5 min a 10 °C e o pellet lavado com água destilada seguido de duas lavagens em acetona. Por último, os grânulos foram recuperados por centrifugação e secos a 60 °C até peso constante.

3.7 Avaliação do crescimento celular e produção de poli(3-hidroxibutirato) utilizando o efluente

A avaliação prévia foi realizada utilizando o efluente como meio de cultivo nas concentrações de 100, 75 e 50 % (v/v) diluído em água destilada. Para tanto, o efluente teve seu pH ajustado para 7,5 ($\pm 0,1$) com NaOH sólido/HCl concentrado e centrifugado a 4300 x g

por 5 min para remoção completa dos sólidos suspensos. Em seguida, o meio foi esterilizado a 121 °C por 21 min para inativação completa dos micro-organismos contaminantes presentes no efluente. O crescimento celular foi realizado em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do efluente esterilizado e nas devidas concentrações. Os meios foram inoculados com 4 % (v/v) de uma pré-cultura em fase estacionária com DO₆₀₀ de 1,2 ($\pm 0,1$), obtida em meio LB a 30 °C e 160 rpm. As culturas foram crescidas por 72 h a 30 °C e 160 rpm com amostras coletadas a cada 24 h, através da retirada de três frascos aleatórios do sistema. As concentrações de biomassa e P(3HB) foram analisadas conforme descrito no item 3.6.

3.8 Produção de poli(3-hidroxibutirato) utilizando o efluente como única fonte de nutrientes

Para este experimento, o meio de cultivo para a produção de P(3HB) foi elaborado utilizando o efluente como única fonte de nutrientes. Para tanto, o efluente teve seu pH ajustado para 7,5 ($\pm 0,1$) com NaOH sólido/HCl concentrado e centrifugado a 4300 x g por 5 min para remoção completa dos sólidos suspensos. Em seguida, o meio foi esterilizado a 121 °C por 21 min e o pH reajustado para 7,5 ($\pm 0,1$) com NaOH/HCl 5 M previamente à inoculação. Os cultivos foram realizados conforme descrito no item anterior (3.7).

3.9 Métodos alternativos à esterilização para descontaminação microbiológica do efluente

Como alternativas para descontaminação microbiológica do efluente, foram testadas as seguintes estratégias: tratamento sem correção de pH (TT), com correção prévia de pH (TpH) e a calagem (CT), com diferentes tratamentos térmicos. Como tratamentos térmicos, foram escolhidos a pasteurização (PT), aquecimento em autoclave por vapor fluente (VF) e esterilização em autoclave (ET). Todos os tratamentos foram realizados com o mesmo lote de efluente coletado e filtrado conforme descrito no item 3.5. Os parâmetros utilizados nos diferentes tratamentos estão descritos a seguir na Tabela 4.

Após os tratamentos foram analisados: valores finais de pH, °Brix e a presença de micro-organismos contaminantes. Esta última avaliação foi realizada através da inoculação de 0,1 mL do efluente tratado em placas de Petri contendo os meios de cultivo ágar-nutriente,

(Himedia, M001) para análise de bactérias heterotróficas ou ágar malte levedura, (Himedia, M424) para análise de bolores e leveduras. Após a inoculação as placas foram incubadas a 30°C por 24 h.

Os efluentes provenientes dos tratamentos positivos para descontaminação e que apresentaram perfis apropriados de pH e °Brix foram avaliados para a produção de biomassa e P(3HB) conforme metodologias descritas nos itens 3.6 e 3.7.

Tabela 4. Parâmetros utilizados nos métodos de descontaminação microbiológica do efluente

Estratégia ¹	Tratamento térmico ²	pH	Ajuste com	Temperatura (°C)	Tempo (min)
TT	-	4,30	-	-	-
	PT	4,30	-	70	30
	VF	4,30	-	105	20
	ET	4,30	-	121	21
TpH	PT	7,23	NaOH	70	30
	VF	7,25		105	20
	ET	7,23		121	21
CT	PT	7,24	Ca(OH) ₂	70	30
	VF	7,22		105	10
	VF	7,23		105	20
	VF	7,24		105	30
	ET	7,22		121	21

¹ TT: sem correção de pH; TpH: com correção prévia de pH; CT: calagem.

² PT: pasteurização; VF: aquecimento em autoclave por vapor fluyente; ET: esterilização em autoclave.

*Todos os tratamentos passaram por processo de centrifugação (4300 x g, 5 min) após o resfriamento.

3.10 Avaliação dos métodos de destoxificação do efluente

Para os experimentos de destoxificação, o efluente foi esterilizado a 121°C por 21 min e fracionado em quatro alíquotas de 100 mL. Cada alíquota foi submetida a um tratamento diferente conforme descrito a seguir: *Overliming* - ajuste do pH para 7,5 com solução esterilizada de Ca(OH)₂ e densidade relativa de 14 °Baumé; carvão ativado - homogeneização com carvão ativado esterilizado nas concentrações de 33, 50 e 100 g/L. Todas as soluções referentes aos tratamentos foram incubadas por 1 h a 30 °C sob agitação de 160 rpm e em seguida centrifugados a 4300 x g por 5 min para remoção das partículas sólidas. A avaliação do crescimento da bactéria *H. hydrothermalis* utilizando o efluente destoxificado por essas diferentes técnicas foi realizada em triplicata utilizando frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do efluente destoxificado. Os cultivos foram inoculados com 4 % (v/v) de

uma pré-cultura com densidade óptica de 1,2 em 600 nm obtido em meio LB. Os frascos foram incubados a 30 °C e 160 rpm por 24 h e a concentração celular, determinada por gravimetria conforme descrito anteriormente.

3.11 Análise da produção de poli(3-hidroxibutirato) por citometria de fluxo

A análise da produção de P(3HB) por citometria de fluxo foi realizada quantificando a fluorescência emitida pelo vermelho do Nilo, após marcação nas células (ALVES *et al.*, 2017). Para isto, 1 mL do cultivo foi centrifugado a 13400 x g por 1 min. e o sobrenadante descartado. O pellet de células foi ressuspendido em 1 mL de solução de permeabilização TBAC (tampão fosfato salino 1X, EDTA 1 mM e Tween 20, 0,01 %) diluído em igual volume de etanol absoluto. Para coloração dos grânulos intracelulares, após 1 min de incubação no tampão de permeabilização, as células foram incubadas com 31,25 µM de vermelho do Nilo durante 1 min. no escuro. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 13400 x g por 1 min, ressuspendidas em 1 mL de TBAC e imediatamente analisadas. A análise de citometria foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri C5® equipado com um laser de 488 nm. Os valores da mediana da fluorescência foram obtidos a partir dos histogramas no canal FL2-H 585/40 nm. Foi realizada a aquisição de 100 mil eventos em cada amostra. Para calibração e validação do equipamento foi utilizado o padrão Spherothech 8-peak (BD Accuri™).

3.12 Quantificação do poli(3-hidroxibutirato) por cromatografia gasosa

A análise foi realizada pela conversão do P(3HB) intracelular em monômeros de ésteres metílicos de 3-hidroxibutirato (Me3HB) e posterior quantificação por cromatografia gasosa (GC), conforme previamente descrito por Braunegg e colaboradores (1978). Para tanto, a biomassa celular liofilizada foi transferida para tubos de borosilicato com tampa de rosca e submetida à metanólise em solução contendo 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol contendo 15 % de ácido sulfúrico. A reação foi incubada por 3,5 h a 100 °C. Previamente à metanólise, foi adicionado a cada reação 0,5 mg de ácido benzoico utilizado como padrão interno da reação. Após a reação, foi adicionado a cada tubo 1 mL de água destilada e homogeneizado em vórtex por 60 s. A fase aquosa superior foi descartada e a fase orgânica inferior contendo o Me3HB foi seca utilizando Na₂SO₄ anidro e reservada. A análise de GC

foi realizada em cromatógrafo gasoso Varian modelo 450-GC acoplado ao detector de ionização de chama FID e coluna CP-Sil-5 CB (10 m x 0,53 mm). Como gás de arraste foi utilizado argônio com vazão de 0,9 mL/min. As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas para 250 e 275 °C, respectivamente. A temperatura do forno foi configurada para: inicial a 50°C por 2 min, aquecimento de 50 °C até 110 °C a 20 °C/min e finalmente aquecimento até 250 °C a 20 °C/min. A quantidade de P(3HB) em cada amostra foi normalizada pela concentração de biomassa seca utilizada e expressa como percentual de P(3HB)/biomassa seca.

3.13 Influência dos ácidos acético, cítrico e fórmico sobre a produção de poli(3-hidroxibutirato)

Devido ao valor de pH necessário para o crescimento do micro-organismo, os ácidos fórmico, acético e cítrico foram utilizados em suas respectivas formas de sal. Os ensaios foram realizados em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio mínimo M9 modificado com composição básica conforme descrito no item 3.3. A glucose e os ácidos orgânicos foram adicionados ao meio de cultura em quatro tratamentos diferentes. Estas substâncias foram adicionadas em concentração de forma a ser obtido a mesma concentração de carbono em g/L (g/L-C) em todos os meios de cultivo. Os tratamentos foram denominados de: T1 - glucose a 4 g/L-C; T2 - glucose a 1,66 g/L-C e acetato de sódio a 2,34 g/L-C; T3 - glucose a 1,66 g/L-C e citrato de sódio a 2,34 g/L-C; T4 - glucose a 1,66 g/L-C e formiato de sódio a 2,34 g/L-C. A glucose foi utilizada como fonte de carbono juntamente com os ácidos orgânicos, uma vez que, em estudos prévios proporcionou melhor crescimento celular em relação as demais fontes de carbono. Os cultivos foram realizados em triplicata para cada condição e inoculados com 4 % (v/v) de uma pré-cultura com densidade óptica de 1,2 em DO₆₀₀ obtida em meio LB. Em seguida, os meios foram incubados a 30 °C e 160 rpm por 24 h, o crescimento celular foi avaliado através da densidade óptica DO₆₀₀ e a produção de P(3HB) por citometria de fluxo conforme descrito no item 3.11.

3.14 Influência da glucose e frutose na produção poli(3-hidroxibutirato)

Os efeitos de diferentes concentrações de glucose como única fonte de carbono na produção de P(3HB) foram realizados em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 25

mL de meio mínimo M9 conforme composição descrita no item 3.3. Neste ensaio foi utilizado glucose como única fonte de carbono nas concentrações de 5, 50 e 100 g/L, que geraram concentrações de carbono de 2, 20 e 40 g/L respectivamente.

A avaliação do efeito da frutose como única fonte de carbono foi realizada de forma semelhante ao descrito para glucose, porém com frutose em uma única concentração de 5 g/L ou 2 g/L de carbono.

A avaliação da produção de P(3HB) na presença da mistura entre frutose e glucose foi realizada utilizando estes dois monossacarídeos nas concentrações de 23 e 13 g/L, respectivamente. Estes valores foram escolhidos de forma a simular a concentração dos monossacarídeos presentes no efluente em estudo.

Os cultivos acima mencionados foram inoculados com 4 % (v/v) de uma pré-cultura com DO₆₀₀ de 1,2 obtida em meio LB. Em seguida, os meios foram incubados a 30°C e 160 rpm por 24 h. Todos os ensaios descritos foram realizados em triplicata e a produção de P(3HB) determinada através da metodologia de citometria de fluxo conforme descrito no item 3.11. A determinação do crescimento celular foi realizada através da medida da densidade óptica do cultivo (DO₆₀₀).

3.15 Efeito da relação carbono e nitrogênio (C/N) no acúmulo de poli(3-hidroxibutirato) intracelular

O efeito da relação C/N na produção de P(3HB) foi avaliado utilizando o efluente como meio de cultivo e suplementado com NH₄Cl como fonte de nitrogênio. As relações C/N avaliadas foram de 10/1, 30/1 e 50/1, obtidas com a adição de NH₄Cl nas concentrações de 11,14, 1,19 e 0 g/L, respectivamente. Após a esterilização em autoclave a 121 °C por 21 min, o pH dos meios foi reajustado para 7,5 ($\pm 0,1$) com NaOH/HCl 5 M. Em seguida, os meios foram inoculados com 4 % (v/v) de uma pré-cultura em fase estacionária com DO₆₀₀ de 1,2 ($\pm 0,1$) produzida em meio LB a 30 °C e 160 rpm. O crescimento celular nos três diferentes meios foi realizado por 24 h a 30 °C e 160 rpm. As concentrações de biomassa e P(3HB) foram determinadas conforme descrito no item 3.6. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em frascos de 125 mL contendo 25 mL de meio de cultivo.

3.16 Otimização da produção de poli(3-hidroxibutirato)

3.16.1 Seleção das variáveis do processo que afetam a produção de poli(3-hidroxibutirato)

A metodologia de Plackett-Burman (PB) foi utilizada para selecionar as variáveis do processo que afetam a produção de P(3HB) por *H. hydrothermalis* utilizando o efluente como única fonte de nutrientes. Foi utilizado um Plackett-Burman de 12 ensaios com 3 repetições no ponto central, tendo temperatura, pH inicial, agitação, inóculo e tempo como variáveis independentes e produção de P(3HB) (g/L) como variável resposta. Os intervalos de cada variável foram selecionados com base na literatura e estão apresentados juntamente com os valores dos pontos centrais na Tabela 5. Os experimentos foram planejados e analisados utilizando o software Protimiza.

Tabela 5. Níveis das variáveis independentes utilizadas no Plackett-Burman.

Variáveis	Nível inferior (-1)	Nível central (0)	Nível superior (1)
X₁ – Temperatura (°C)	25	31	37
X₂ – pH Inicial	6	7,5	9
X₃ – Agitação (rpm)	100	175	250
X₄ – Inóculo (% v/v)	4	7	10
X₅ – Tempo (h)	24	48	72

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do efluente como única fonte de nutrientes. Cada frasco foi considerado como uma amostra independente do experimento. A quantificação da biomassa e do P(3HB) foi realizada conforme descrito no item 3.6.

3.16.2 Otimização da produção de poli(3-hidroxibutirato) por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A otimização da produção de P(3HB) pela bactéria *H. hydrothermalis* utilizando o efluente como única fonte de carbono foi realizada pela metodologia de superfície de resposta Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Com base nos resultados obtidos na análise de PB, as variáveis tempo e pH inicial foram escolhidas para a realização da análise de DCCR conforme os níveis descritos na Tabela 6. As demais condições de cultivo como

temperatura, agitação e volume de inóculo foram fixadas em 37 °C, 250 rpm e 4 % (v/v), respectivamente.

Tabela 6. Níveis das variáveis independentes utilizadas no delineamento composto central rotacional.

Variáveis Independentes	Níveis reais e codificados das variáveis independentes				
Níveis codificados	-1,41	-1	0	1	+1,41
Tempo (h)	62,06	72	96	120	129,94
pH Inicial	7,59	8	9	10	10,41

Os ensaios foram realizados em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do efluente como única fonte de nutrientes. Cada frasco foi considerado como uma amostra independente do experimento. A quantificação da biomassa e do P(3HB) foi realizada por gravimetria, conforme descrito no item 3.6. Os experimentos foram planejados e analisados utilizando o software Protimiza.

3.17 Caracterização do poli(3-hidroxibutirato) produzido utilizando o efluente como única fonte de nutrientes

A extração do biopolímero para a etapa de caracterização foi realizada de acordo com Ramsay e colaboradores (1994) devido à menor degradação do polímero relatados na literatura para esta metodologia. De forma breve, as células de um cultivo realizado conforme descrito no item 3.8 foram recuperadas por centrifugação a 4300 x g por 5 min a 10 °C e imediatamente congeladas a -80 °C e liofilizadas. O P(3HB) intracelular da biomassa liofilizada foi extraído por clorofórmio a 65 °C por 8 h em refluxo fechado. A biomassa residual foi removida da solução por filtração em papel de filtro Whatman N°1 e o filtrado contendo o polímero solubilizado foi concentrado 3 vezes em rotaevaporador a 45 °C e pressão reduzida. O P(3HB) foi precipitado por gotejamento da solução contendo o polímero em 10 volumes de etanol gelado e em seguida foi recuperado e seco a 60 °C até peso constante.

A caracterização do polímero foi realizada pelas técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , análise térmica (Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Termogravimetria (TG)) e por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A análise de RMN foi realizada utilizando 10 mg do polímero diluído em clorofórmio deuterado e os espectros

obtidos a 30 °C utilizando espectrômetro DRX 400 Avance (Bruker, USA). Para a análise de DSC, 5 mg do biopolímero foi pesado em cadinho de Al₂SO₃ e aquecido de 25 a 200 °C. A TG foi realizada de forma similar, porém, com variação de temperatura de 25 a 800 °C. Ambas as análises foram realizadas em analisador térmico STA 449 F3 Jupiter (Netzsch, Germany) com taxa de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera de nitrogênio. Como padrão para as análises térmicas foi utilizada o P(3HB) comercial produzido pela empresa Biocycle (Serrana, SP/Brasil). A análise de infravermelho foi realizada no Departamento de Farmácia da UFPR através do espectrômetro modelo Alpha (Bruker Optics, USA) incorporado à transformada de Fourier com acessório de reflectância total atenuada. Para a análise foram pesados aproximadamente 2 mg da amostra liofilizada e analisada entre 400 e 4000 cm⁻¹. Os espectros obtidos foram analisados utilizando o programa OPUS 6.5 (Bruker Optics, USA).

3.18 Avaliação prévia da produção de biossurfactante por *Halomonas hydrothermalis*

A produção de biossurfactante pela bactéria *H. hydrothermalis* foi realizada cultivando o micro-organismo no efluente como única fonte de nutrientes, conforme descrito no item 3.8. A extração do biossurfactante foi realizada segundo a metodologia descrita por Gudina e colaboradores (2015) sem as etapas de purificação. De forma breve, as células do cultivo foram separadas por centrifugação a 18000 x g por 5 min e o sobrenadante acidificado até pH 2,0 (± 0,1) com HCl 5 M. Em seguida, o sobrenadante acidificado foi deixado em repouso por 24 h a 4 °C e novamente centrifugado a 18000 x g por 5 min para coleta do precipitado. O pellet formado foi ressuspenso em água destilada com 1/3 do volume referente ao sobrenadante do cultivo utilizado. Após isto, o pH da solução foi ajustado para 7,5 (± 0,2) com NaOH 1 M e dialisado em membrana de 1 kDa contra água ultrapura até resultado negativo para detecção de açúcares no eluido, pela técnica de fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). Em seguida, a amostra foi recuperada, liofilizada e utilizada para as análises descritas a seguir. A fração obtida nesta etapa foi denominada de BH1.

A presença do biossurfactante no extrato bruto foi avaliada através dos testes do colapso de gota conforme descrito por Sajna e colaboradores (2013), e de emulsificação em querosene conforme descrito por Singh e colaboradores (2014). O teste do colapso de gota foi realizado avaliando a mudança no formato da gota após transferir 25 µL da fração BH1 solubilizada a 1 mg/mL em água ultrapura e corada com azul de bromofenol 0,1 % (m/v) para uma tira de Parafilm®. Para a avaliação da emulsificação em querosene foram transferidos 2

mL da fração BH1 a 1 mg/mL em água ultrapura para tubos de boro silicato com tampa de rosca e homogeneizados, por 2 min a 2000 rpm em vórtex, com 2 mL de querosene. Em seguida, a mistura foi deixada em repouso por 24 h a 4 °C e a estabilidade da emulsão foi verificada. Como controles negativo e positivo em ambos experimentos, foram utilizados água destilada e dodecil sulfato de sódio (SDS) 1 % (m/v), respectivamente.

3.19 Caracterização da fração BH1 contendo o biossurfactante

A caracterização prévia da fração BH1 foi realizada através das análises para determinação de proteínas pela técnica de reação com ninhidrina (HARDING; WARNEFORD, 1916), carboidratos totais pela metodologia de fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956) e teor de sulfatos (DODGSON, 1961). Estas metodologias foram realizadas com o intuito de identificar a composição básica da fração e não de quantificar os compostos analisados.

A fração BH1 foi analisada, também, pela técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Para tanto, aproximadamente 2 mg da amostra liofilizada foi pesada e analisada entre os comprimentos de onda de 400 e 4000 cm^{-1} utilizando espectrômetro modelo Alpha (Bruker Optics, USA) incorporado à transformada de Fourier com acessório de reflectância total atenuada localizado no Departamento de Farmácia (UFPR). Os espectros obtidos foram analisados utilizando o programa OPUS 6.5 (Bruker Optics, USA).

A homogeneidade da fração BH1 foi analisada por Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão (HPSEC). Para esta análise, a amostra foi solubilizada na concentração de 1 mg/mL em solução de nitrito de sódio (NaNO_2 0,1M) contendo azida de sódio (NaN_3 200 ppm). Após solubilização, a amostra foi filtrada em filtro de acetato de celulose (0,22 μm) e aplicada em cromatógrafo (Waters, USA) equipado com quatro colunas de gel permeação em série com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 (UltrahydrogelTM 2000, 500, 200 e 120, respectivamente). Os detectores utilizados foram os de índice de refração (IR) modelo 240 (Waters, USA), espalhamento de luz em multiângulo (MALLS) modelo DAWN DSP com dezoito detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos (Wyatt Technology, USA) e detector ultravioleta Pharmacia LKB Uvicord VW2251 a 280 nm (UV). O eluente utilizado na cromatografia teve composição similar à solução para solubilização da amostra e utilizado com pressão de 920 psi a 20 °C. A análise

dos dados obtidos foi efetuada utilizando o programa ASTRA (Wyatt Technology, USA).

3.20 Estratégias de separação e purificação parcial do biossurfactante

As metodologias aplicadas para a purificação da fração BH1 e os métodos alternativos para a extração do biossurfactante a partir do sobrenadante do cultivo estão descritas a seguir no Quadro 4. Estas estratégias foram escolhidas de forma a testar diferentes metodologias, uma vez que na literatura são citadas diversas formas de extrair e recuperar esta classe de biomolécula.

Quadro 4. Descrição das metodologias aplicadas na separação e purificação do biossurfactante

Metodologia	Frações	Descrição
Precipitação ácida	BH1	Centrifugação do cultivo a 10000 x g por 5 min a 10 °C, acidificação do sobrenadante com HCl 2 M até pH 2,0. Repouso da amostra por 24 h a 4 °C, recuperação do precipitado por centrifugação a 4300 x g por 5 min a 10 °C. Solubilização em água ultrapura e ajuste do pH para 8,0 com NaOH 5M. Diálise em membrana de 1 kDa contra água ultrapura seguida por liofilização.
Partição com clorofórmio	BH2	Solubilização da fração BH1 (1 mg/mL) em água ultrapura e ajuste do pH para 8,0 com NaOH. Adição de mesmo volume em clorofórmio P.A. e homogeneização em funil de separação até formação de emulsão da fase orgânica. Repouso do material por 24 h a 20 °C para separação das fases aquosa (BH3) e orgânica (BH2). Coleta da fase orgânica e evaporação do clorofórmio em rotaevaporador a 35 °C e -400 mmHg. Secagem das frações por liofilização.
	BH3	
Precipitação com etanol	BH4	Solubilização da fração BH1 (1 mg/mL) em água ultrapura e ajuste do pH para 8,0 com NaOH. Adição de etanol (3 vol) e separação do sobrenadante (BH4) e precipitado (BH5) por centrifugação a 4300 x g por 5 min e 10 °C. Evaporação do etanol em estufa a vácuo a 40 °C e -560 mmHg seguido de liofilização das frações.
	BH5	
Precipitação com sulfato de amônio	BH8	Centrifugação do cultivo a 10000 x g por 5 min a 10 °C e recuperação do sobrenadante. Precipitação do biossurfactante por adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 15 % da saturação em 20 °C. Recuperação do precipitado por centrifugação a 4300 x g por 5 min a 20 °C. Solubilização do precipitado em água ultrapura e diálise em membrana de 1 kDa contra água ultrapura. Liofilização da fração para acondicionamento.
	BH9	Recuperação do sobrenadante gerado na precipitação da fração BH8 e adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 20 % da saturação a 20 °C. Etapas posteriores realizadas conforme descrito para obtenção da fração BH8.

Continuação do Quadro 4

Ultrafiltração	BH11	Solubilização da fração BH1 (1 mg/mL) em água ultrapura e ajuste do pH 8,0 com NaOH 5M. Solução submetida à ultrafiltração em membrana de 1000 kDa sob pressão de 1 bar. Recuperação das frações retida (BH11) e eluída (BH12). Liofilização das frações para acondicionamento.
	BH12	
Precipitação ácida	BH13	Metodologia similar à descrita para a obtenção da fração BH1, porém com ajuste do pH para 3 com HCl 5M na fase de precipitação.
Precipitação por aquecimento	BH16	Solubilização da fração BH1 (1 mg/mL) em água ultrapura e ajuste do pH para 8 com NaOH 5M. Aquecimento da amostra a 85 °C por 10 min seguido por resfriamento em banho de gelo. Separação das frações: solúvel (BH16) e precipitado (BH17) por centrifugação a 10000 x g por 5 min a 10 °C.
	BH17	

As frações obtidas foram analisadas quanto à ação emulsificante em querosene e homogeneidade de acordo com as metodologias descritas nos itens 3.18 e 3.19.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito da temperatura, pH e concentração salina no crescimento celular

O crescimento da bactéria *H. hydrothermalis* foi avaliado nas temperaturas de 10, 20, 30 e 40 °C, sendo possível identificar que este organismo possui melhor desenvolvimento em temperatura próxima de 30 °C (Figura 7). Estes resultados condizem com os dados demonstrados na literatura que indicam o crescimento dos micro-organismos deste gênero em temperaturas que variam de 5 a 45 °C e temperaturas ótimas próximas a 30 °C, dependendo da espécie (KAYE *et al.*, 2004; DOU *et al.*, 2015). O crescimento em baixas temperaturas, como observado neste trabalho, pode ser um dos fatores que permitem a presença destes organismos em ambientes marinhos, que por sua vez podem chegar a temperaturas inferiores a 5 °C (DALMASO *et al.*, 2015).

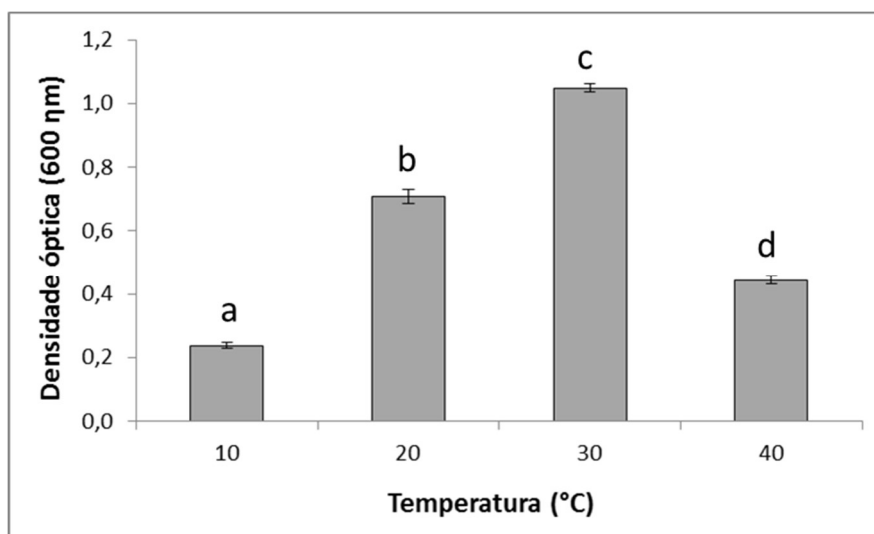


Figura 7. Efeito da temperatura no crescimento celular. Ensaios realizados em meio LB a 160 rpm por 24 h. Crescimento celular avaliado através da densidade óptica do cultivo a 600 nm. Análise realizada com triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

A avaliação do efeito do pH no crescimento celular foi realizada comparando as fases de crescimento logarítmica nas quatro diferentes condições (Figura 8), isto foi necessário uma vez que, durante o crescimento celular ocorre a modificação do pH nos diferentes cultivos com a tendência de se igualarem após atingir a fase estacionária. Foi observado que a bactéria possui melhor crescimento entre os valores de pH 7 e 8 e velocidade de crescimento menor nos valores de pH 6 e 9. De acordo com a literatura, as bactérias do gênero *Halomonas*

possuem a capacidade de crescer em condições de pH que podem variar entre 5 e 12 (KAYE *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2007). O pH ótimo para este gênero varia de acordo com a espécie, porém vários autores relatam valores próximos a 8 (KAYE *et al.*, 2004; QU *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2014; DOU *et al.*, 2015)

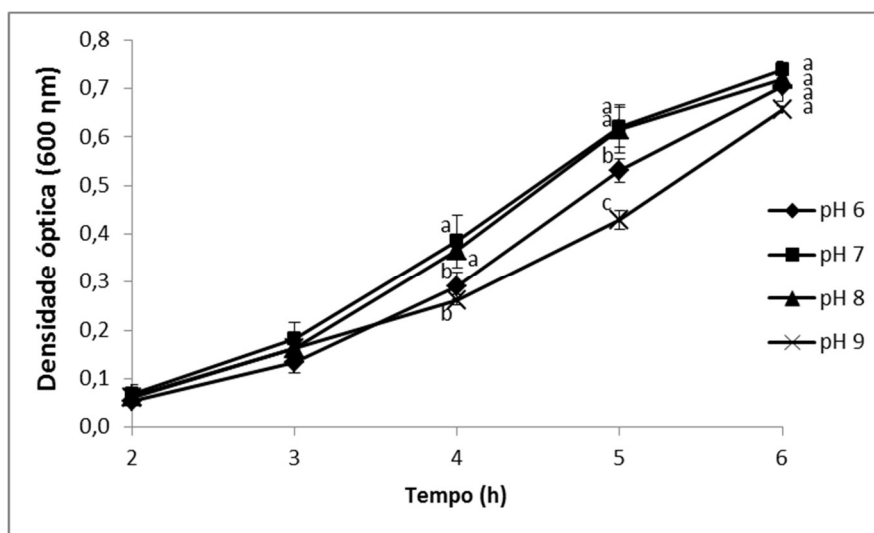


Figura 8. Efeito do pH no crescimento celular. Ensaios realizados em meio LB a 30 °C e 160 rpm. Amostras coletadas a cada hora e analisadas pela densidade óptica a 600 nm. Análise realizada com triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

O micro-organismo de estudo foi avaliado quanto ao crescimento celular em diferentes condições de salinidade. Na Figura 9 é possível observar que o micro-organismo apresenta crescimento semelhante nas concentrações de NaCl que variam entre 0 e 25 g/L, sendo observada a redução discreta no crescimento acima de 30 g/L de NaCl e acentuado decréscimo da biomassa a partir de 50 g/L. Apesar na redução do crescimento celular de forma significativa na concentração de 50 e 70 g/L de NaCl pode-se observar que o organismo é capaz de crescer nesta condição. A resistência a condições de alta salinidade já era esperada para o organismo em estudo, uma vez que, a bactéria *H. hydrothermalis* caracteriza-se como um organismo halotolerante (KAYE *et al.*, 2004). A halotolerância destes organismos se dá pela capacidade de produzir osmoprotetores, como ectoína ou hidroxiectoína, glicina, betaína ou outros glicerídeos neutros (ROMANO *et al.*, 2001; DIKEN *et al.*, 2015; DALMASO *et al.*, 2015).

A utilização de um micro-organismo halotolerante confere uma vantagem produtiva em relação aos demais, uma vez que, em cultivos com elevada concentração de sais ocorre à inibição de micro-organismos contaminantes diminuindo assim possíveis gastos com

esterilização dos meios de cultivo e controles de esterilidade (HAMPP, 2004; QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2010; TAN *et al.*, 2011).

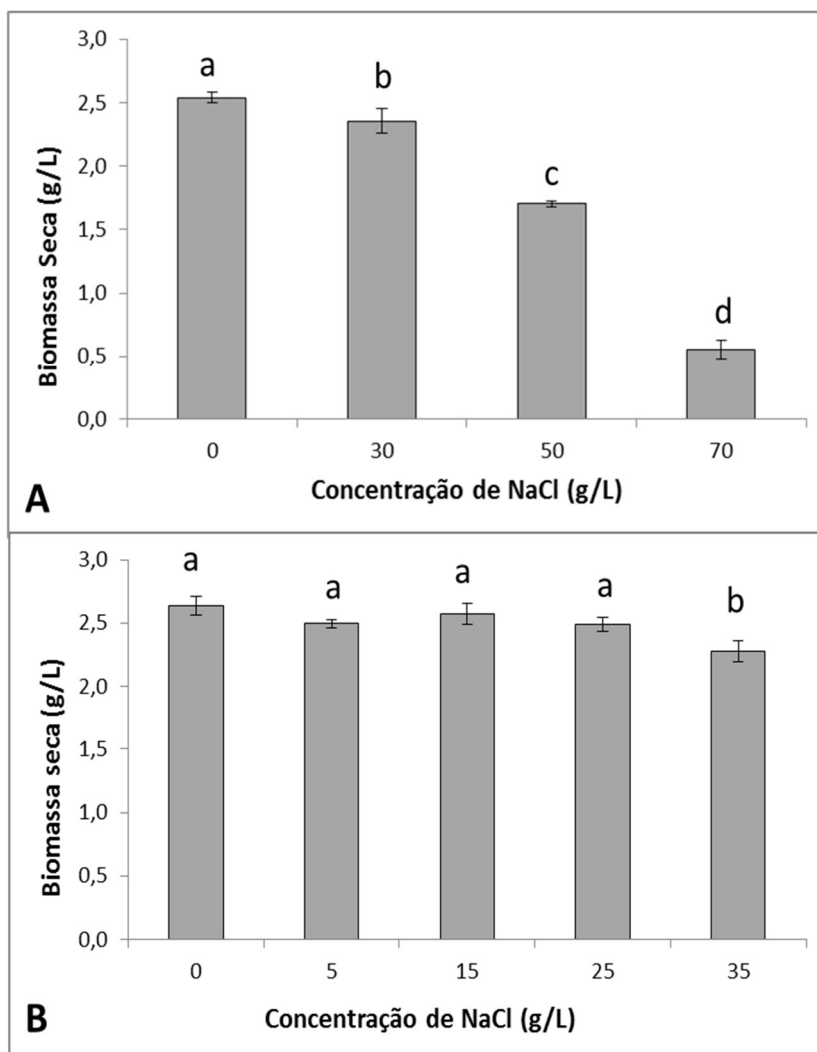


Figura 9. Efeito da concentração de NaCl no crescimento celular. Ensaio efetuado em meio LB modificado com concentração de NaCl variando de 0 a 70 g/L (A) e 0 a 35 g/L (B). Cultivo realizado por 24 h, 30 °C e 160 rpm. Análise realizada com triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

4.2 Análise do crescimento celular em diferentes fontes de carbono

Com base nos resultados obtidos, foi observado que a bactéria *H. hydrothermalis* possui preferência pela utilização de glucose em relação às demais fontes de carbono testadas, uma vez que, possui maior crescimento com esta fonte de carbono (Figura 10).

O crescimento celular utilizando os carboidratos maltose e sacarose mostrou-se semelhante, indicando a possibilidade do organismo em produzir as enzimas necessárias para

a conversão dos dissacarídeos em seus respectivos monossacarídeos, assim como para o dissacarídeo lactose. A enzima sacarose-fosforilase (EC 2.4.1.7) responsável pela conversão da sacarose em frutose e glucose fosforilada estão descritas no banco de dados Uniprot para 5 linhagens diferentes de *Halomonas*, porém, a enzima β -fructofuranosidase (EC 3.2.1.26), que possui ação semelhante de hidrólise não é relatada para este grupo de organismos. Wang e colaboradores (2013) e Williamson e colaboradores (2016) descreveram a presença da enzima β -galactosidase (EC 3.2.1.23) responsável pela conversão da lactose em galactose e glucose em *Halomonas* sp. S62 e *Halomonas* sp. R5-57, respectivamente, enquanto no banco de dados Uniprot são descritas as entradas para *Halomonas* sp. S62 e *Halomonas* sp. HL-48. A hidrólise da maltose pode ser realizada pela enzima α -glucosidase (EC 3.2.1.20) já descrita na literatura para espécies do gênero *Halomonas*, possuindo 39 entradas no banco de dados Uniprot sendo uma delas para o organismo *H. hydrothermalis* (GUZMÁN *et al.*, 2012; OJIMA *et al.*, 2012).

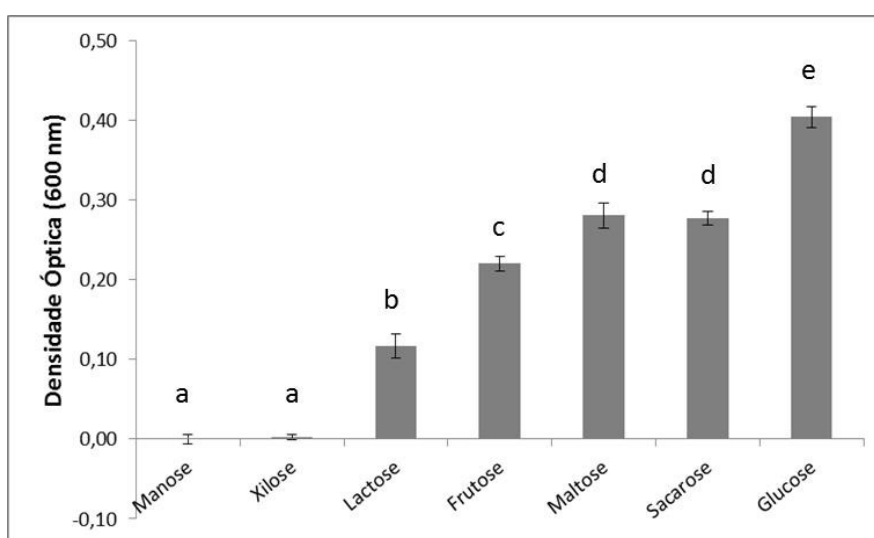


Figura 10. Avaliação do crescimento celular em função da fonte de carbono. Cultivo realizado em meio mínimo M9 acrescido de diferentes fontes de carbono a 30 °C, 160 rpm e 24 h de cultivo. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

Outra característica observada foi à incapacidade do organismo em utilizar manose e xilose como únicas fontes de carbono na condição testada. A não utilização da xilose por diferentes espécies do gênero *Halomonas* já foi descrita na literatura (MORMILE *et al.*, 1999; QU *et al.*, 2011; DOU *et al.*, 2015). Esta característica foi observada especificamente em *H. hydrothermalis* por Kaye e colaboradores (2004), corroborando desta forma com os dados obtidos neste trabalho. Porém, os resultados obtidos por estes autores foram divergentes ao

nosso quanto à capacidade da bactéria em utilizar a manose como fonte de carbono indicando que a espécie é capaz de metabolizar este monossacarídeo. Kim e colaboradores (2007) descreveram o isolamento das espécies *Halomonas gomseomensis*, *Halomonas janggokensis* e *Halomonas denitrificans* que não possuem a capacidade de utilizar manose como única fonte de carbono.

A partir destes resultados, foi verificado que o organismo em estudo provavelmente possui a capacidade de crescer em efluentes industriais ou substratos de baixo custo que contenham estes carboidratos em sua composição, tais como o soro de leite, melaço de cana, vinhaça e o efluente do descarte de hortifrutigranjeiros que será discutido mais para frente.

4.3 Produção de enzimas hidrolíticas por *Halomonas hydrothermalis*

Foi possível identificar que a bactéria *H. hydrothermalis* possui a capacidade de produzir todas as enzimas hidrolíticas avaliadas (Figura 11). Diversos autores já descreveram a produção de enzimas hidrolíticas por micro-organismos de origem marinha, porém, a produção destas biomoléculas pelo organismo em estudo não foi relatada até o momento.

Dentre as bactérias marinhas, as pertencentes ao gênero *Halomonas* possuem considerável importância na produção de enzimas hidrolíticas, sendo possível observar diversos trabalhos relatando a produção destas moléculas por este grupo de organismos. Como exemplo destes trabalhos, temos a produção de α -amilase por *Halomonas meridiana* com atividade ótima em concentração salina de 10 % e pH 7,0, e com 40 % de atividade residual quando utilizada em pH 10 (CORONADO *et al.*, 2000). Outro exemplo é o trabalho realizado por Uzyol e colaboradores (2012) que descreveram uma α -amilase de *Halomonas* sp. AAD21 termoestável com capacidade de manter atividade de 70 % após incubação a 90 °C por 120 min. Ainda, os trabalhos de Gupta e colaboradores (2016) com a produção de uma glutaminase por *Halomonas venusta* SS5 com atividade ótima quando presente em meio contendo 1,5 M de NaCl e de Yue e colaboradores (2014) que descreveram a produção das enzimas amilase, celulase, lipase e protease de forma simultânea pela bactéria *Halomonas campaniensis* LS21 em sistema de fermentação contínua com meio composto por água do mar e substrato misto. Por último, o trabalho realizado por Rohban e colaboradores (2009) que identificaram a produção das enzimas amilase, lipase, protease, DNase, xilanase, pululanase, pectinase, CMCase e inulinase em organismos do gênero *Halomonas* isolados de ambiente hipersalino.

As enzimas produzidas por micro-organismos halotolerantes ou halófilicos são consideradas promissoras para aplicações industriais, não sendo limitadas apenas a condições de alta salinidade, mas também estáveis em alta temperatura e presença de solventes orgânicos (KUMAR *et al.*, 2012; GURUNG *et al.*, 2013; LOURDES MORENO, DE *et al.*, 2013). De uma forma geral, as enzimas convencionais, quando em condições de baixa atividade de água (A_w) ou alta salinidade sofrem mudanças conformacionais devido à redução da disponibilidade de água para interações químicas, afetando desta forma a atividade enzimática. Porém, enzimas provenientes de organismos halófilos ou halotolerantes são estáveis nestas condições. Isto se dá devido aos grupos hidrofóbicos e carboxílicos presentes na superfície das proteínas, auxiliando nas interações com as moléculas de água e mantendo, assim, a conformação e atividade mesmo em baixa A_w (ZACCAI, 2004; GUPTA *et al.*, 2016).

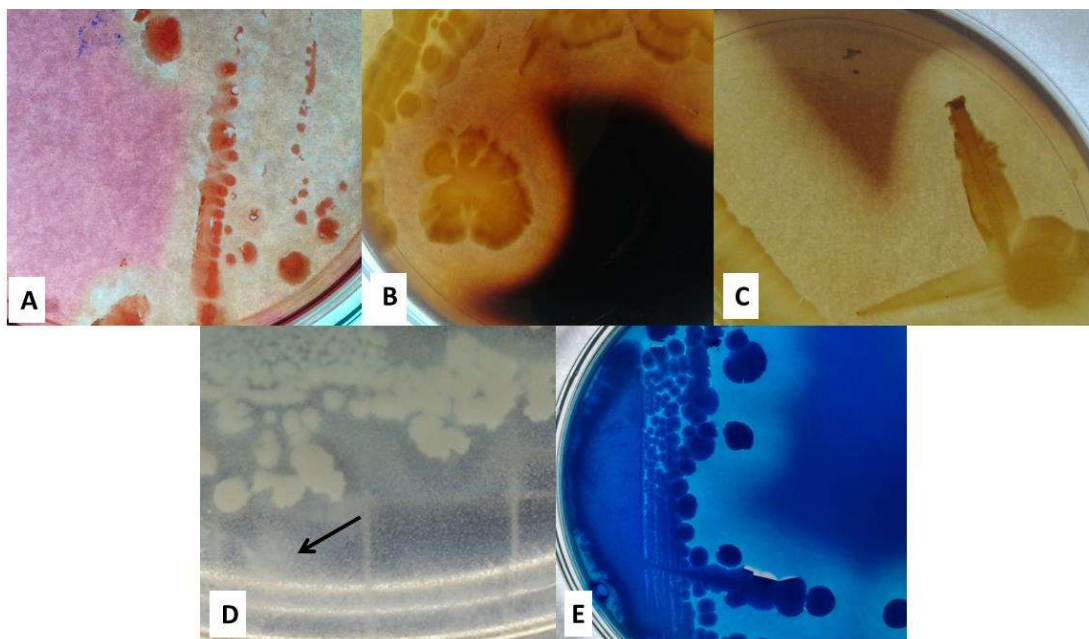


Figura 11. Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas por *H. hydrothermalis*. (A) Atividade de celulase em CMC, regiões claras indicam a degradação da CMC; (B) Atividade de amilase em amido, regiões claras indicam a degradação do amido; (C) Atividade de pectinase em pectina de maçã, regiões claras indicam a hidrólise do polissacarídeo; (D) Atividade de lipase em Tween 20, seta indicando a formação de cristais de cálcio; (E) Atividade de protease em gelatina, regiões claras indicam a degradação das proteínas. Cultivos realizados em meio sólido a 30 °C por 72 h.

A produção destas enzimas pelo organismo possibilita o uso de substratos de baixo custo, tais como celulose, pectina e amido como fonte de carbono para o cultivo. O uso destas matérias-primas nos meios de cultivo permite a redução dos custos operacionais durante a produção de várias biomoléculas, como o P(3HB) e os biossurfactantes (KOLLER *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2013; BANAT *et al.*, 2014). Mais estudos são necessários para verificar

as condições ótimas para atuação das enzimas produzidas por *H. hydrothermalis*, assim como estudos referentes à resistência às possíveis condições adversas encontradas em processos industriais.

4.4 Caracterização do efluente de hortifrutigranjeiros

As características físico-químicas do efluente estão sumarizadas abaixo na Tabela 7 e serão discutidas ao longo deste item.

O efluente estudado neste trabalho pode ser comparado a sucos de vegetais uma vez que é proveniente do esmagamento das frutas, verduras e legumes não comercializados. Os carboidratos podem ser considerados como os principais componentes presentes nos vegetais, sendo a frutose, glucose e sacarose os principais carboidratos solúveis presentes em uma ampla parcela destes vegetais (BRASIL, 2011; DESNOUES *et al.*, 2014). Com base nesta característica, foram analisados pelas técnicas de CCD, RMN de ^{13}C e HPAEC-PAD quais carboidratos simples solúveis estão presentes no efluente de estudo. A partir da técnica de CCD foi possível observar que os carboidratos glucose e frutose são os principais monossacarídeos presentes no efluente (Figura 12).

Tabela 7. Caracterização físico-química do efluente coletado em diferentes datas.

	Maio/2013	Agosto/2014	Abril/2015
Relação C/N	50,2	50,2	49,0
pH	4,2 ($\pm 0,2$)	4,5 ($\pm 0,2$)	4,2 ($\pm 0,3$)
°Brix	8,0 ($\pm 0,1$)	8,0 ($\pm 0,2$)	8,5 ($\pm 0,1$)
Glucose (g/L)	13,6 ($\pm 1,2$)	14,4 ($\pm 1,09$)	14,7 ($\pm 1,45$)
Frutose (g/L)	25,5 ($\pm 1,05$)	24,9 ($\pm 0,95$)	24,1 ($\pm 0,85$)
DQO (mg/L)	42000 (± 380)	43500 (± 240)	42500 (± 80)
NO₂⁻ (mg/L)	10,61 ($\pm 1,26$)	17,74 ($\pm 0,54$)	18,67 ($\pm 0,44$)
NO₃⁻ (mg/L)	55,39 ($\pm 0,47$)	36,60 ($\pm 0,16$)	30,22 ($\pm 0,56$)
NTK (mg/L)	952,00 ($\pm 37,04$)	947,33 ($\pm 35,23$)	989,33 ($\pm 21,39$)
PO₄³⁻ (mg/L)	114,21 ($\pm 0,97$)	136,45 ($\pm 5,44$)	197,47 ($\pm 1,33$)
Lipídios totais (mg/L)	0,38 ($\pm 0,07$)	0,62 ($\pm 0,05$)	0,46 ($\pm 0,09$)

Relação C/N: relação carbono/nitrogênio; DQO: Demanda Química de Oxigênio; NTK: Nitrogênio total Kjeldhal.

Os resultados obtidos na CCD foram confirmados pela técnica de RMN de ^{13}C através dos deslocamentos químicos na região de carboidratos idênticos aos obtidos para os respectivos padrões (Figura 13). Os deslocamentos químicos entre 90 e 105 ppm obtidos no

espectro do efluente podem ser atribuídos aos carbonos anoméricos das moléculas de glucose e frutose nas isoformas α e β . A presença de sacarose no efluente foi descartada pela ausência dos deslocamentos químicos em 103,8, 76,5, 61,4 e 60,1 ppm atribuídos a este dissacarídeo.



Figura 12. Análise dos carboidratos simples solúveis presentes no efluente por CCD. (1) D-glucose, (2) D-frutose, (3) Sacarose, (4) Mistura de D-glucose, D-frutose e sacarose, (5) Efluente bruto. Todos os padrões foram utilizados na concentração de 10 mg/mL e aplicadas com 6 spots. Efluente aplicado na forma bruta com 3 spots. Fase móvel composta por acetato de etila: ácido acético: n-propanol: água (4:2:2:1). Revelador Orcinol-sulfúrico/aquecimento.

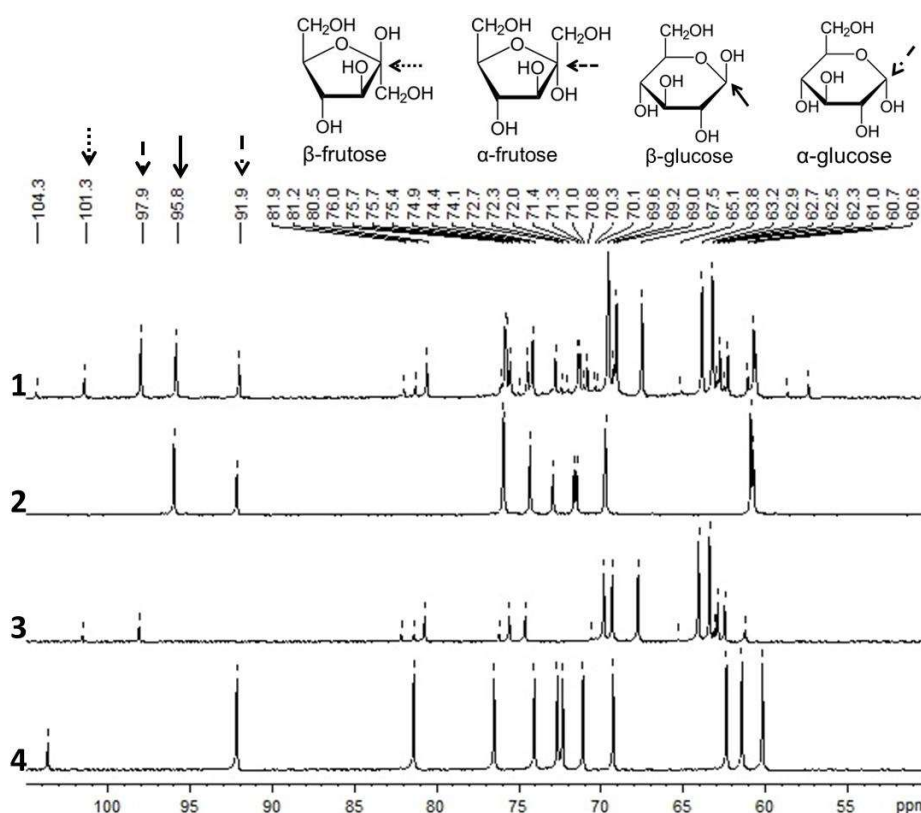


Figura 13. Comparação dos espectros de RMN de ^{13}C do efluente bruto e padrões de carboidratos. Efluente bruto (1), D-glucose (2), D-frutose (3) e Sacarose (4). Padrões analisados na concentração de 60 mg/mL solubilizados em $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1). Efluente liofilizado e solubilizado em $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (9:1) na concentração de 300 mg/mL. Espectros calibrados a partir do deslocamento químico da acetona em 30.2 ppm obtidos a 30 °C em espectrômetro modelo DRX 400 Avance serie (Bruker, USA).

A identificação e quantificação dos monossacarídeos presentes no efluente por HPAEC-PAD revelou alta concentração de glucose e frutose, com aproximadamente 14 e 25 g/L, respectivamente. A concentração dos açúcares solúveis em frutas e vegetais varia conforme o estágio de maturação e consequentemente o tempo de colheita (BASSON *et al.*, 2010; DESNOUES *et al.*, 2014). Em uma grande parcela das frutas e vegetais os principais carboidratos simples solúveis são a frutose seguida pela glucose, porém, em alguns poucos exemplos a sacarose pode exceder a concentração destes dois monossacarídeos (Tabela 8). A não detecção de sacarose no efluente pode ser explicada pela baixa concentração desta molécula nos vegetais e, também, pela possível conversão enzimática em seus respectivos monossacarídeos através de enzimas provenientes dos micro-organismos nativos.

Tabela 8. Quantidade de carboidratos solúveis em frutas, legumes e vegetais.

Frutas, legumes e vegetais*	Frutose (g)	Glucose (g)	Sacarose (g)
Maçã, bruto, com casca	5,90	2,43	2,07
Abacate, bruto, todas as variedades	0,12	0,37	0,06
Alface, bruto	1,45	1,67	0,08
Berinjela, bruto	1,54	1,59	0,26
Laranja, bruto,	2,25	1,97	4,28
Mamão, bruto	3,73	4,09	0,00
Pimentões, doce, vermelho, bruto	2,26	1,94	0,00
Abacaxi, bruto, todas as variedades	2,12	1,73	5,99
Tomate, vermelho, bruto, maduro	1,37	1,25	0,00
Melancia, bruto	3,36	1,58	1,21

* Frutas, legumes e vegetais escolhidos com base na presença observada nos compactadores localizados no CEASA-PR

Todos os valores estão expressos em gramas por 100 g de amostra.

Referência: adaptado de USDA, (2015)

Diferentemente dos monossacarídeos glucose e frutose, os lipídios foram identificados em baixa concentração no efluente, com aproximadamente 0,5 mg/L. Diferentes autores já relataram a presença de lipídios em sucos de frutas e outros vegetais em concentrações que variam conforme a matéria-prima utilizada. Por exemplo, os lipídios podem ser encontrados em sucos de tomate em concentrações próximas de 1 g/L, enquanto em suco de laranja a concentração destas moléculas é menor, podendo chegar a 680 mg/L (NORDBY; NAGY, 1969; ARENA *et al.*, 1998; GARCÍA-ALONSO *et al.*, 2012). Para alguns micro-organismos, os lipídios são melhor aproveitados em relação aos carboidratos para a conversão em P(3HB) ou outras moléculas, como os biossurfactantes (KOLLER *et al.*, 2010; BUDDE *et al.*, 2011; GUMEL *et al.*, 2012).

De acordo com diferentes autores a relação C/N no meio de cultivo é uma importante característica para a produção de P(3HB), uma vez que vários micro-organismos são induzidos a produzir e estocar esta molécula quando cultivados em condições de alta relação C/N (JOHNSON *et al.*, 2010; RAI; ROY, 2011; PEÑA *et al.*, 2014). O efluente em estudo apresenta relação C/N de aproximadamente 50/1 e, desta forma, se mostra interessante para os estudos de produção de P(3HB). A alta relação C/N presente no efluente pode indicar neste caso baixa concentração de nitrogênio; esta informação foi confirmada pela somatória das formas de nitrogênio nitrato, nitrito e NTK que juntas fornecem menos de 1 g/L de nitrogênio ao efluente. De acordo com Kaye e colaboradores (2004), a bactéria *H. hydrothermalis* Slthf2, similar à utilizada neste estudo, é capaz de crescer na presença de nitrato, nitrito e uma ampla gama de aminoácidos, indicando, assim que todas as formas de nitrogênio encontradas no efluente podem ser utilizadas para o cultivo celular. Assim como as demais análises os valores de °Brix dos diferentes efluentes se mostram próximos, indicando a presença de concentrações de sólidos solúveis estáveis nos diferentes períodos de coleta.

A DQO é um importante parâmetro a ser avaliado em efluentes e águas residuais, uma vez que indica o potencial poluidor quando os efluentes são descartados de forma incorreta e o possível valor econômico para remoção da matéria orgânica. A matéria orgânica total presente no efluente em estudo acarreta em altos valores de DQO, que podem chegar a 42000 mg/L. Este efluente pode ser comparado a outros efluentes reconhecidamente poluentes como o soro de leite, manipueira e vinhaça, que apresentam valores de DQO próximos a 50000, 20000 e 50000 mg/L, respectivamente (SREETHAWONG *et al.*, 2010; RICO *et al.*, 2015; SANTOS, DOS *et al.*, 2016). Os efluentes informados acima tem sido alvo de estudos como fonte de nutrientes em processos fermentativos para a produção de diversas biomoléculas, desta forma reduzindo os custos de produção e de tratamento de efluentes. De acordo com o exposto, foi identificado grande potencial na utilização do efluente gerado a partir do descarte de hortifrutigranjeiros para a produção de P(3HB) e outras moléculas utilizando processos fermentativos.

4.5 Produção de biomassa e poli(3-hidroxibutirato) utilizando o efluente como única fonte de nutrientes

A avaliação prévia do crescimento celular e a produção de P(3HB) foram realizadas utilizando o efluente concentrado e nas diluições de 75 e 50 % (v/v) em água destilada, de

forma a verificar se a concentração de nutrientes presentes no efluente interfere na produção de biomassa e do biopolímero. Para esta análise, os cultivos tiveram seu primeiro ponto amostral em 24 h seguido de amostragens em 48 e 72 h. Estes tempos amostrais foram escolhidos uma vez que trabalhos utilizando micro-organismos e meios diversos relatam a produção máxima de P(3HB) após 20 h de cultivo ou já em fase de crescimento estacionária (CASTILHO *et al.*, 2009). Foi identificada a inibição do crescimento microbiano nos cultivos utilizando o efluente nas concentrações de 75 e 100 %, sendo a melhor condição para o crescimento celular na diluição de 50 % (Figura 14). Durante esta avaliação foi observada a precipitação de material em suspensão proveniente do efluente, o qual gerou os resultados superestimados de biomassa obtidos para os efluentes na concentração de 75 e 100 %. No tratamento composto por 50 %, situação semelhante foi observada, porém, com menor concentração em relação ao efluente 100 % e que foi levada em consideração para calcular a concentração real de biomassa.

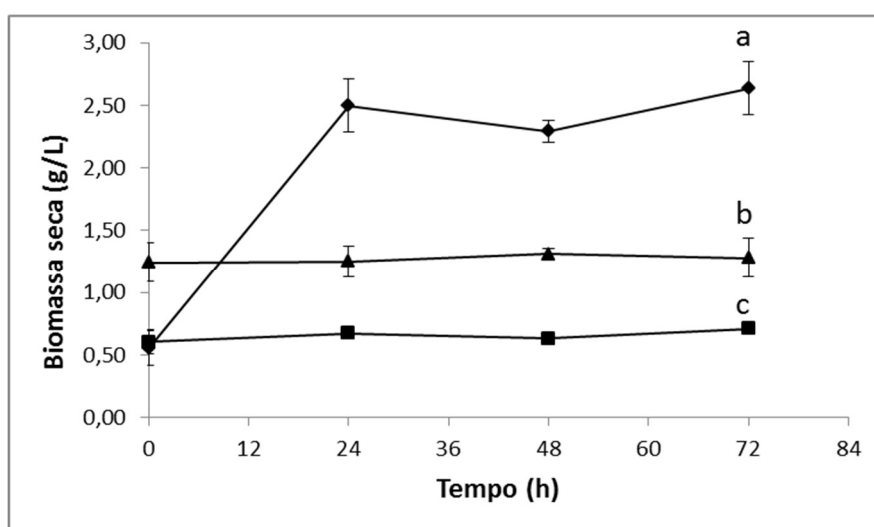


Figura 14. Avaliação do crescimento celular no efluente como única fonte de nutrientes. Ensaios realizados utilizando efluente nas concentrações de (▲) 100, (■) 75 e (◆) 50 % (v/v) com diluições em água destilada. Cultivo realizado a 30 °C e 160 rpm. Biomassa recuperada por centrifugação (4300 x g, 10 min) e liofilização até peso constante. Ensaio realizado em triplicata para cada tempo e concentração. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

A condição de cultivo utilizando o efluente a 50 % produziu uma concentração de 2,0 g/L em 24 h de fermentação. Após este período, o microrganismo já se apresenta na fase estacionária de crescimento para a condição definida. Em relação à produção de P(3HB), utilizando o efluente como única fonte de nutrientes, foi verificada que o organismo possui a

capacidade de sintetizar e estocar biopolímero em uma concentração que representa aproximadamente 33 % da biomassa seca bacteriana em 48 h de cultivo (Figura 15). As concentrações de biomassa e P(3HB) obtidas nesta condição foram ligeiramente inferiores à encontrada por Takahashi (2012), que utilizou a mesma cepa microbiana para a produção de P(3HB) em um meio sintético utilizando glicerol como fonte de carbono. No trabalho supracitado, o autor obteve biomassa na concentração de 2,7 g/L com 45 % de P(3HB) intracelular em base seca.

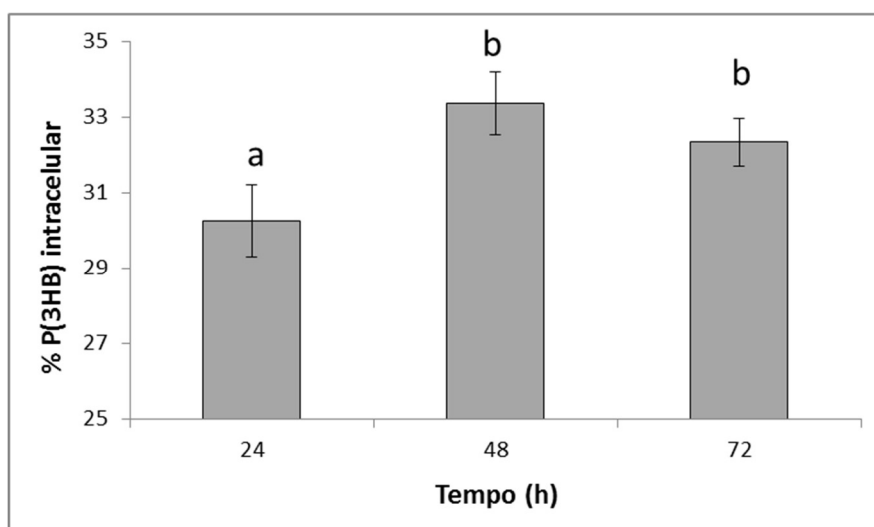


Figura 15. Concentração de P(3HB) intracelular produzido utilizando o efluente diluído a 50 % (v/v) como fonte de nutrientes. Cultivo realizado a 30 °C e 160 rpm. Biomassa recuperada por centrifugação (4300g, 10 min) e seca por liofilização até peso constante. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

Até o momento da confecção deste manuscrito, a produção de P(3HB) através do efluente proveniente de hortifrutigranjeiro não tinha sido citada na literatura. Porém, diversos trabalhos citam a produção deste biopolímero utilizando outros tipos de resíduos e efluentes, como na produção do copolímero de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) P(HB-co-HV) em *Escherichia coli* recombinante nas concentrações de 5,5 e 16,5 g/L, utilizando soro de leite e glicerol, respectivamente (KOLLER *et al.*, 2005). Neste contexto, outro exemplo é o trabalho desenvolvido por Verlinden e colaboradores (2011) que obtiveram produtividade de 1,2 g/L de P(3HB) a partir de *Cupriavidus necator* utilizando óleo de fritura como fonte de carbono. Por último, a utilização de farelo de trigo hidrolisado para o cultivo de *H. boliviensis* LC1 com produção de biomassa na concentração de 3,2 g/L e P(3HB) intracelular de 34 % (VAN-THUOC *et al.*, 2008). Desta forma, os resultados obtidos com o efluente proveniente

de hortifrutigranjeiro são similares aos dados reportados na literatura. Ressalta-se que os resultados apresentados até o momento no presente trabalho são valores sem otimização de processo ou verificação de melhores condições para o cultivo.

De forma a verificar o efeito de diluições mais amplas do efluente no crescimento da bactéria, foram realizados cultivos com o efluente em concentrações variando de 30 a 80 % (v/v). Nestes testes, os cultivos foram realizados de forma semelhante aos testes iniciais, porém, com amostragem em apenas 24 h, uma vez que não foi percebida a variação da biomassa após este período de tempo. Conforme Figura 16, pode-se identificar que o início da inibição do crescimento ocorre nas concentrações entre 50 e 60 % (v/v) com inibição completa em concentrações superiores a estes valores. Para valores de concentrações inferiores a 50 % (v/v), ocorre a diminuição da concentração de biomassa proporcionalmente à concentração do efluente. Esta redução pode ser explicada pela redução da concentração de nutrientes presentes no meio de cultivo.

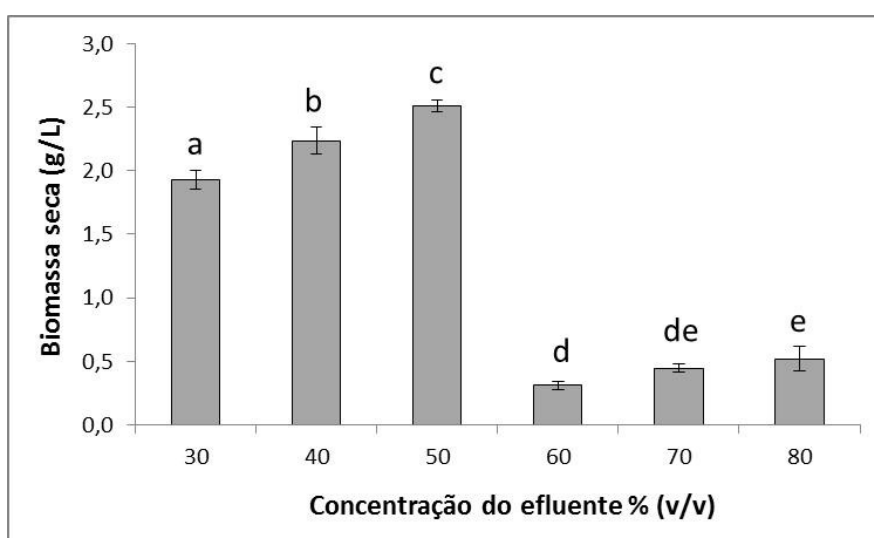


Figura 16. Efeito da diluição do efluente no crescimento celular. Efluente diluído em água destilada e esterilizado por 21 min a 121 °C. Cultivo realizado a 30 °C e 160 rpm. Biomassa recuperada após 24 h de cultivo por centrifugação (4300 x g, 10 min) seguida de liofilização. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste de Dunn. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

Outra característica importante a ser observada foi a redução do pH do efluente após a etapa de esterilização, que variou de 7,5 para aproximadamente 5,7 (Figura 17). Porém, não se pode explicar a inibição do crescimento pela redução do pH, pois estes valores foram similares para os efluentes com diferentes concentrações. Além disto, conforme resultado anteriormente apresentado, foi demonstrado que o organismo em estudo possui a capacidade

de crescer neste valor de pH (Item 4.1, Figura 8). Os fatores que levaram à redução do pH após a esterilização serão discutidos nos próximos itens.

Tendo em vista a abrupta inibição de crescimento e a fim de verificar o comportamento do organismo dentro da faixa de diluição compreendida entre 50 e 60 % (v/v) foi realizado um novo experimento (Figura 18). Este experimento foi realizado de forma semelhante ao citado anteriormente utilizando o efluente dentro desta faixa de diluição. Verificou-se que o crescimento celular é inibido gradativamente com o aumento da concentração do efluente (Figura 18). Nas concentrações de 57 e 60 % (v/v) os valores de biomassa recuperados referem-se somente ao material decantado proveniente do efluente após a esterilização, não havendo crescimento celular.

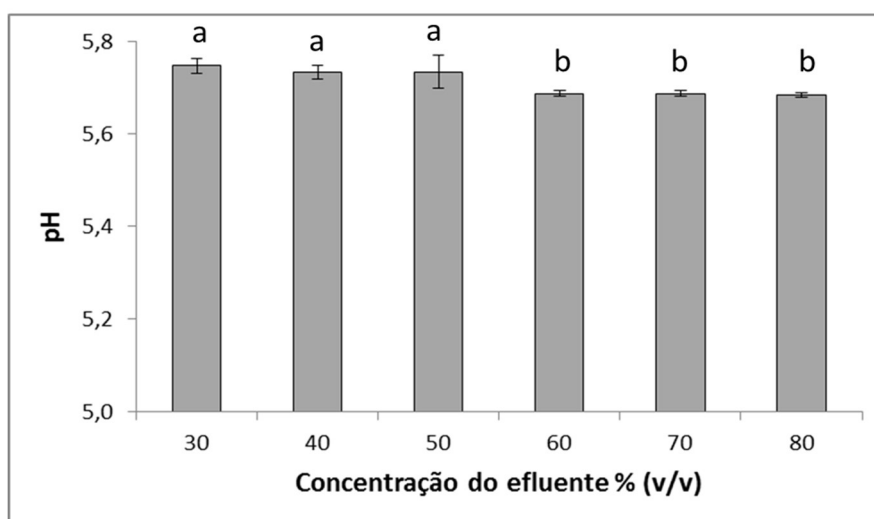


Figura 17. Variação do pH após a esterilização conforme concentração do efluente (pH inicial 7,5). Efluente diluído em água destilada e esterilizado por 21 min a 121 °C. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

Com base nos resultados obtidos sugere-se que a inibição do crescimento celular no efluente pode ser atribuída, entre outras coisas, à presença de compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas como os ácidos orgânicos e compostos fenólicos. Estas substâncias são reconhecidas na literatura por atuarem na defesa da planta, sendo capazes de inibir o crescimento de diversos micro-organismos (RAUHA *et al.*, 2000; FITE *et al.*, 2004; BALASUNDRAM *et al.*, 2006; FÜRSTENBERG-HÄGG *et al.*, 2013). Outra possível explicação para este efeito pode estar relacionada à formação de compostos tóxicos durante a esterilização do efluente, tais como o 5-hidroximetilfurfural (HMF) ou, ainda, à presença de agrotóxicos provenientes do processo produtivo dos vegetais. Desta forma, foi percebida a

necessidade de avaliar a presença destes compostos no efluente utilizado.

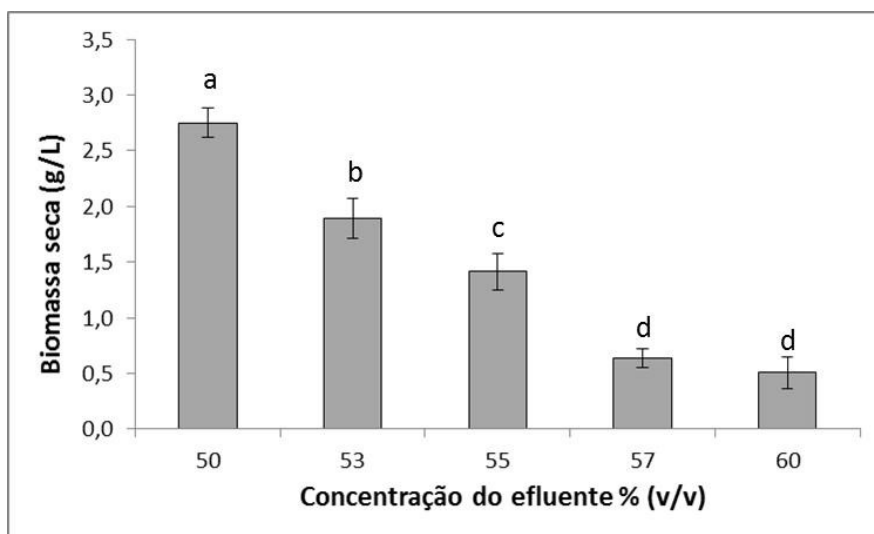


Figura 18. Avaliação do crescimento celular com o efluente nas concentrações entre 50 e 60 % (v/v). Efluente diluído em água destilada e esterilizado por 21 min a 121 °C. Cultivo realizado a 30 °C e agitação de 160 rpm. Biomassa recuperada após 24 h de cultivo por centrifugação (4300 x g, 10 min) seguida de liofilização. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

4.5.1 Efeito do ácido cítrico sobre o crescimento celular

O ácido cítrico é o principal ácido orgânico encontrado em frutas, verduras e legumes, podendo ser encontrado em diferentes concentrações, dependendo do tipo de vegetal e do estágio de maturação (FLORES *et al.*, 2012; MAGAIA *et al.*, 2013). A ação inibitória dos ácidos orgânicos pode ser atribuída à redução do pH (PIPER *et al.*, 2016) ou pela remoção de minerais do meio de cultivo através da complexação entre os minerais e o ácido orgânico (STRATFORD *et al.*, 2013).

Na Figura 19A, é possível observar que a inibição do crescimento microbiano em função da concentração de ácido cítrico ocorre apenas na concentração de 10 g/L, enquanto nas demais concentrações o crescimento foi similar ao controle durante as primeiras horas de cultivo. Após 24 h de incubação, foi possível observar o crescimento celular no tratamento contendo 10 g/L de ácido cítrico, porém, com desenvolvimento de apenas 50 % da densidade óptica em relação as demais concentrações (Figura 19B). A partir destes resultados, demonstra-se que o ácido cítrico é capaz de retardar o crescimento celular, porém, não inibi-lo completamente, como ocorre quando o efluente é utilizado em concentração acima de 57 % (v/v) conforme anteriormente discutido.

O uso de citrato como única fonte de carbono pela bactéria *H. hydrothermalis* é relatado na literatura por diversos autores (KAYE *et al.*, 2004; ROMANO *et al.*, 2006; JIANG *et al.*, 2013). Com base nestas informações, a inibição microbiana observada no efluente não pode ser atribuída à presença do ácido cítrico, uma vez que a concentração deste composto no efluente é de aproximadamente 3,0 g/L, consideravelmente inferior à concentração inibitória descrita em trabalhos prévios e nos resultados aqui demonstrados.

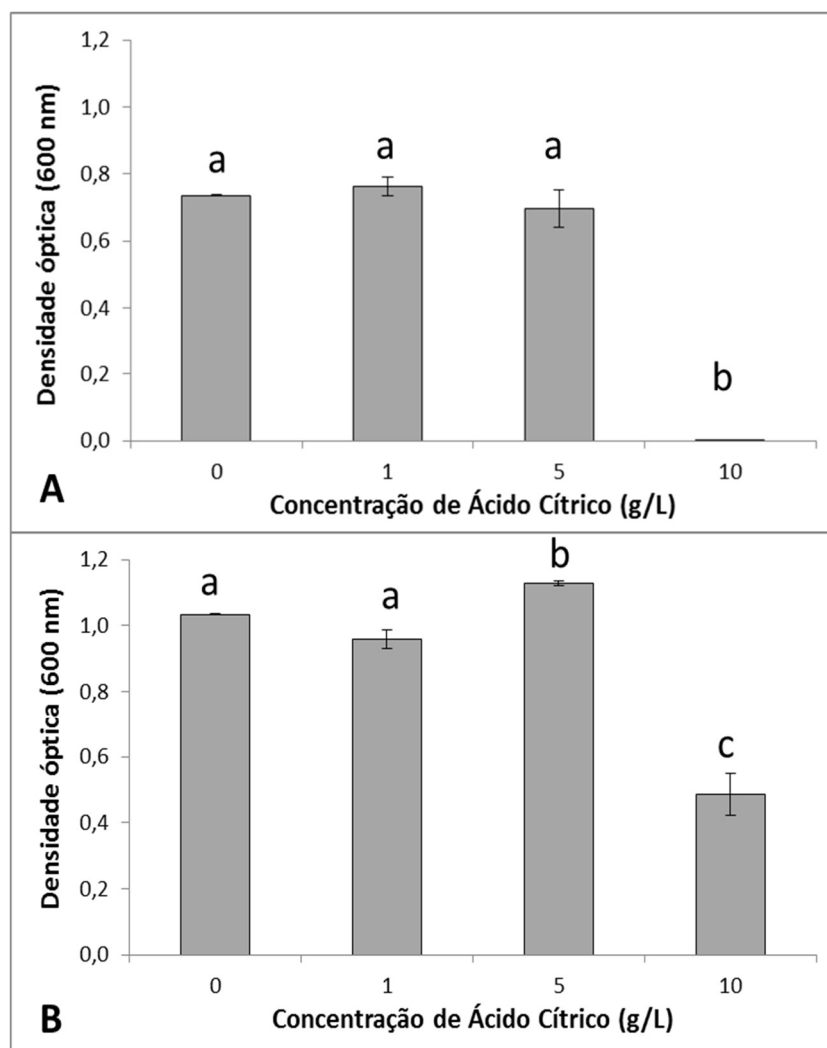


Figura 19. Avaliação do crescimento celular em função da concentração de ácido cítrico. (A) Avaliação do cultivo ao final da fase logarítmica de crescimento e (B) após 24 h de cultivo. Cultivo realizado em meio LB suplementado com ácido cítrico nas concentrações de 0, 1, 5 e 10 g/L. Cultivo realizado a 30 °C e agitação de 160 rpm. Densidade óptica obtida a 600 nm. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % comparando as médias par a par pelo teste t de Student. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

4.5.2 Avaliação da presença de resíduos de agrotóxicos

A avaliação da presença de agrotóxicos no efluente foi realizada no Laboratório de Agroquímica no Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). O ensaio de multirresíduos de agrotóxicos foi realizado por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) e contou com a avaliação de aproximadamente 120 compostos com limite de detecção de 5µg/L conforme Anexo 8.1.

Segundo o Relatório de Ensaio Tecpar N° 14013690, não foram detectados os princípios ativos pesquisados no limite de detecção utilizado e, portanto, é possível descartar a possibilidade do efeito inibitório do efluente ser proveniente da presença destes agrotóxicos.

4.5.3 Avaliação da presença de hidroximetilfurfural no efluente após esterilização

HMF é um composto normalmente proveniente da desidratação de hexoses em condições ácidas e alta temperatura (AMARASEKARA *et al.*, 2008; QI *et al.*, 2014). A investigação da formação deste composto baseia-se no fato de que o efluente apresenta em sua composição glucose e frutose em alta concentração e durante a etapa de esterilização ocorre a redução do pH para valores próximos de 5,7, o que poderia possibilitar a formação do derivado acima citado.

Até o momento da confecção deste manuscrito não existiam relatos na literatura sobre a influência do HMF no crescimento de *H. hydrothermalis*, porém é descrito o efeito inibitório do HMF em outros micro-organismos. Como exemplo destes trabalhos, tem-se a inibição de *Zymomonas mobilis* durante o cultivo utilizando hidrolisado lignocelulósico (FRANDEN *et al.*, 2013), o trabalho realizado por Quéméneur e colaboradores (2012) que observaram a inibição do crescimento de uma cultura mista durante a produção de hidrogênio, e a inibição de *E. coli* recombinante durante a produção de etanol (MILLER *et al.*, 2010). A concentração inibitória do HMF é variável dependendo da espécie do micro-organismo, sendo a intensidade de inibição proporcional à concentração do inibidor no meio. Janzowski e colaboradores (2000) avaliaram o crescimento da bactéria *Salmonella typhimurium* na presença de HMF nas concentrações entre 8 e 20 mM, e observaram inibição do crescimento em 9 e 41 %, respectivamente. Franden e colaboradores (2013) observaram inibição variando de 25 a 100 % em *Zimomonas mobilis* em concentrações de HMF na ordem de 12 a 63 mM, respectivamente.

A presença de HMF no efluente esterilizado foi analisada pelas técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H . Na Figura 20 é apresentado o resultado da análise de CCD, onde é possível verificar a ausência do HMF na amostra analisada. Devido à possibilidade do HMF estar presente em concentrações abaixo do nível de detecção da CCD, foi realizada a análise de RMN de ^1H , que possui maior nível de sensibilidade para confirmar este resultado.

Na análise de RMN de ^1H não foi possível identificar no efluente os deslocamentos químicos correspondentes ao HMF quando comparados ao padrão (Figura 21). A presença de HMF em baixas concentrações não foi descartada, uma vez que os outros compostos presentes no efluente como frutose e glucose (em maiores concentrações), poderiam dificultar a análise de RMN. Com o objetivo de descartar esta hipótese, foi realizada a análise de RMN de ^1H com o efluente esterilizado acrescentado de HMF na concentração de 2,4 mM (Figura 22). A concentração de HMF escolhida para esta análise foi muito inferior à concentração mínima com efeito inibitório conforme relatado nas literaturas mencionadas anteriormente.

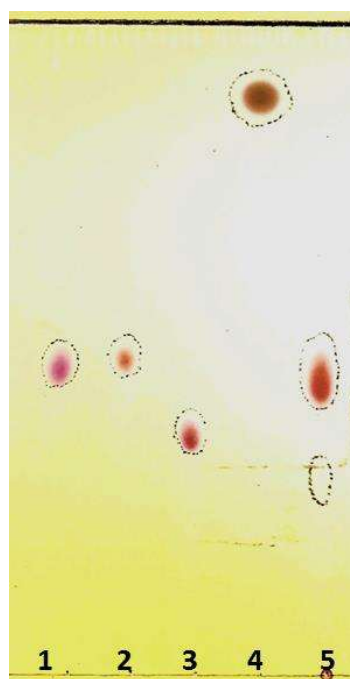


Figura 20. Cromatografia em camada delgada do efluente após a esterilização. (1) padrão de D-glucose, (2) padrão de D-frutose, (3) padrão de sacarose, (4) padrão de HMF e (5) efluente esterilizado. Padrões utilizados na concentração de 10 mg/mL. CCD realizada com fase móvel composta por Acetato de etila:Ácido acético:Propanol:Água (4:2:2:1), revelador Orcinol: H_2SO_4 .

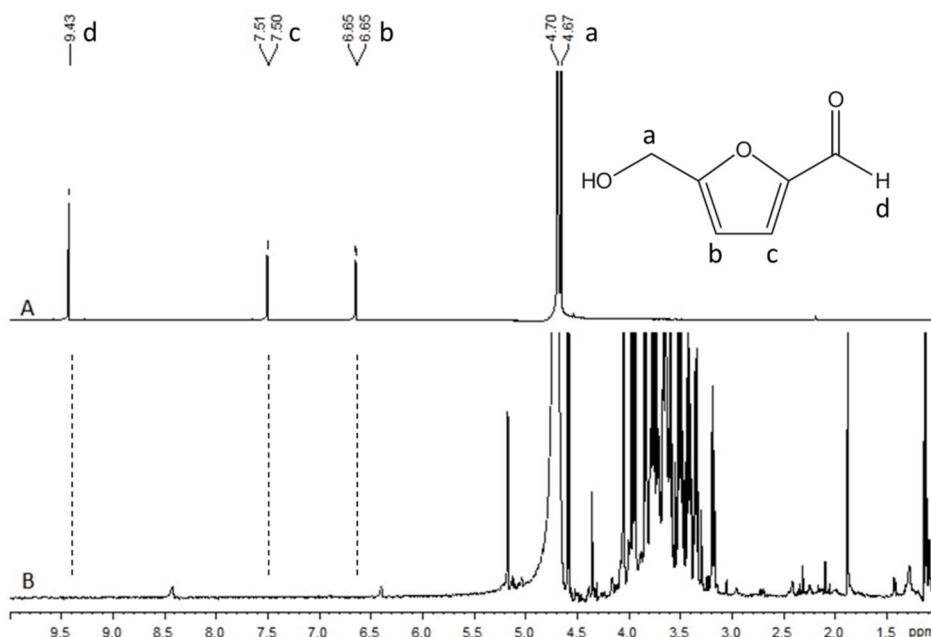


Figura 21. Espectros de RMN de ^1H de HMF e efluente após esterilização. (A) Padrão de HMF na concentração de 10 mg/mL em D_2O ; (B) Efluente esterilizado por 121 °C por 21 min em concentração de 15 mg/mL em D_2O . Análises realizadas a 30°C e espectros calibrados pelo deslocamento químico em 4,70 ppm correspondente ao ^1H da água.

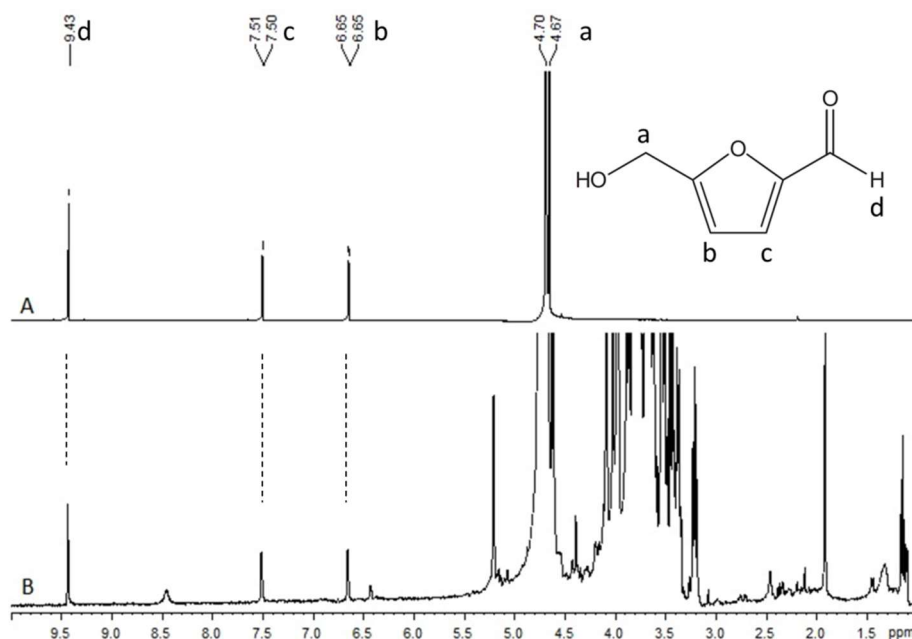


Figura 22. Espectros de RMN de ^1H de (A) HMF e (B) efluente esterilizado acrescido de HMF. Padrão de HMF preparado na concentração de 10 mg/mL em D_2O . Efluente esterilizado (121 °C por 21 min e liofilizado) preparado na concentração de 15 mg/mL em D_2O , acrescido de HMF 2,4 mM. Análise realizada a 30°C e espectros calibrados pelo deslocamento químico em 4,70 ppm correspondente ao ^1H da água.

Com esta análise observou-se que a metodologia empregada é sensível o suficiente para detectar baixas concentrações do inibidor no efluente mesmo quando em conjunto com

outras substâncias em maior concentração. Desta forma, pode ser descartada a possibilidade da presença de HMF em concentrações que inibam o crescimento do micro-organismo sugerindo, assim, que o efeito inibitório seja atribuído a outras substâncias presentes no efluente ou ao conjunto delas.

4.5.4 Avaliação da formação de outros produtos de degradação durante o processo de esterilização do efluente

Como apresentado e discutido anteriormente, foi observado que a esterilização do efluente provoca uma redução no pH (item 4.5, Figura 17). Com o objetivo de tentar explicar o fenômeno que provoca o abaixamento do pH, e avaliar a possível formação de produtos de degradação gerados durante o processo, o efluente foi analisado por RMN de ^1H antes e após esterilização (Figura 23). A comparação dos espectros antes e após esterilização permite identificar alterações no espectro do efluente esterilizado, tais como o aparecimento de sinais que não são detectados no efluente nativo. Alguns desses sinais foram identificados e atribuídos às moléculas de ácido acético e ácido fórmico (Figura 23).

A análise destes compostos foi realizada através de RMN de ^1H devido à alta sensibilidade do método. A comparação entre os espectros de RMN de ^1H dos efluentes esterilizado e bruto também foi necessária para poder descartar a possibilidade de que estes compostos sejam provenientes do metabolismo secundário das plantas ou sintetizados pelos micro-organismos contaminantes previamente à coleta e tratamento. As moléculas em questão não foram observadas no efluente nativo bruto, indicando assim que estes compostos foram gerados durante o processo de esterilização. De acordo com o *Human Metabolome Database* (HMDB), os deslocamentos químicos do ácido fórmico e acético são encontrados em 8,45 e 1,92 ppm, respectivamente, valores estes muito próximos aos encontrados no efluente esterilizado em 8,46 e 1,93 ppm (WHISHART *et al.*, 2009). Esta pequena diferença nos dados pode ser atribuída a variações de pH da amostra ou temperatura de análise.

Os ácidos orgânicos detectados são relatados na literatura como inibidores do crescimento microbiano por diferentes autores (THOMPSON; HINTON, 1997; DENG *et al.*, 2014; XU, J. *et al.*, 2014). Estes compostos possuem diferentes formas de ação sendo as três principais e mais relatadas a destruição do citoplasma por formas não dissociadas que permeiam a parede e membrana celular, inibição de carboxilases e catalases e a redução do pH propriamente dita (MROZ, 2005; CHEUNG *et al.*, 2010).

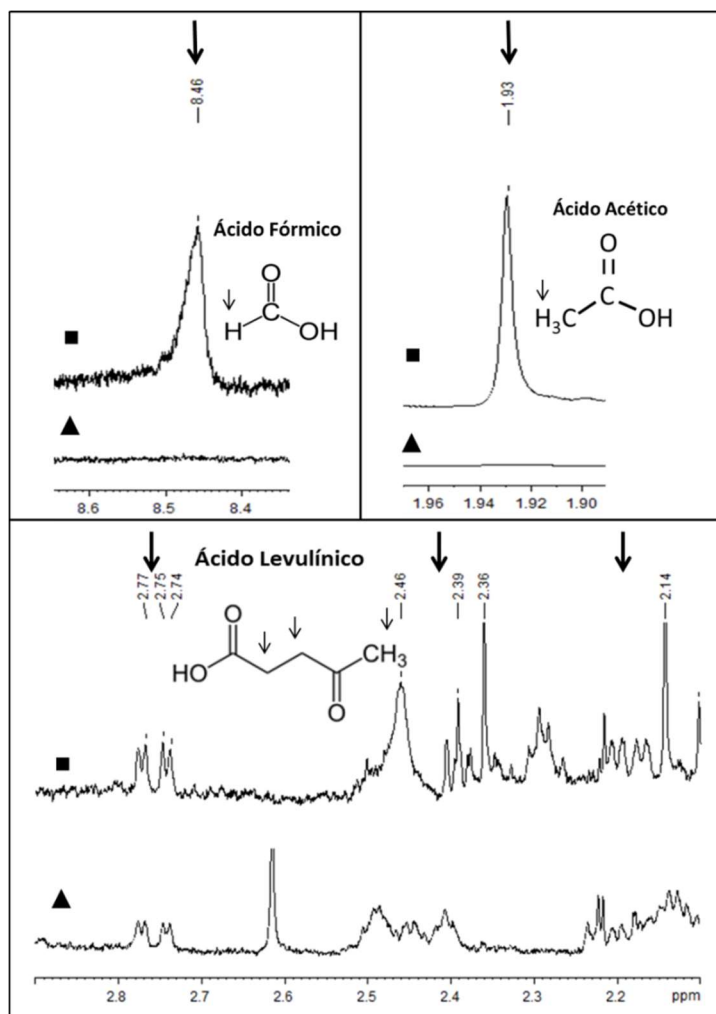


Figura 23. Comparação dos espectros de RMN de ^1H para o efluente bruto (▲) e esterilizado (■). Ácido fórmico (A), ácido acético (B) e ácido levulínico (C). Amostras preparadas na concentração de 15 mg/mL em D_2O . Análise realizada a 30 °C e espectros calibrados pelo deslocamento químico em 4,70 ppm correspondente ao ^1H da água. Setas indicam os locais para aparecimento dos deslocamentos químicos dos ^1H correspondentes as substâncias avaliadas.

A formação destes compostos pode ser induzida durante a esterilização pela degradação térmica e oxidação dos carboidratos, carotenoides, ácidos cítrico, ascórbico e graxo, assim como, através da reação de Maillard (LIMACHER *et al.*, 2008; NIE *et al.*, 2013). Desta forma, o surgimento dos ácidos e consequentemente a redução do pH no efluente após a esterilização pode ser explicada através da degradação de uma parte dos compostos identificados no efluente, tais como: ácido cítrico, carotenoides, glucose e frutose, sendo estes dois últimos encontrados em altas concentrações. Huang e colaboradores (2011) descreveram a formação dos ácidos acético e fórmico a partir dos monossacarídeos glucose e frutose, sendo que esta transformação é favorecida em pH próximo a neutralidade, assim como, na presença de ácido cítrico e tampão fosfato. Neste mesmo trabalho, os autores

relataram que a frutose proporciona maiores concentrações de ácido fórmico em relação à glucose e que ocorre, também, a produção de furano durante a degradação térmica destas moléculas. Este último composto não foi detectado nas análises de RMN de ^1H no efluente esterilizado.

Como uma forma de confirmar se a formação dos supostos inibidores é decorrente da degradação térmica dos carboidratos durante a esterilização do efluente, foi realizada a esterilização (121 °C, 21 min) de uma solução composta por glucose, frutose e ácido cítrico com pH ajustado para 7,5. A solução teste foi elaborada com os componentes nas mesmas concentrações encontradas no efluente de forma a simular as condições químicas do mesmo. Após análise de RMN foi possível identificar os deslocamentos químicos referentes aos ácidos acético e fórmico em 1,92 e 8,45, respectivamente (Figura 24).

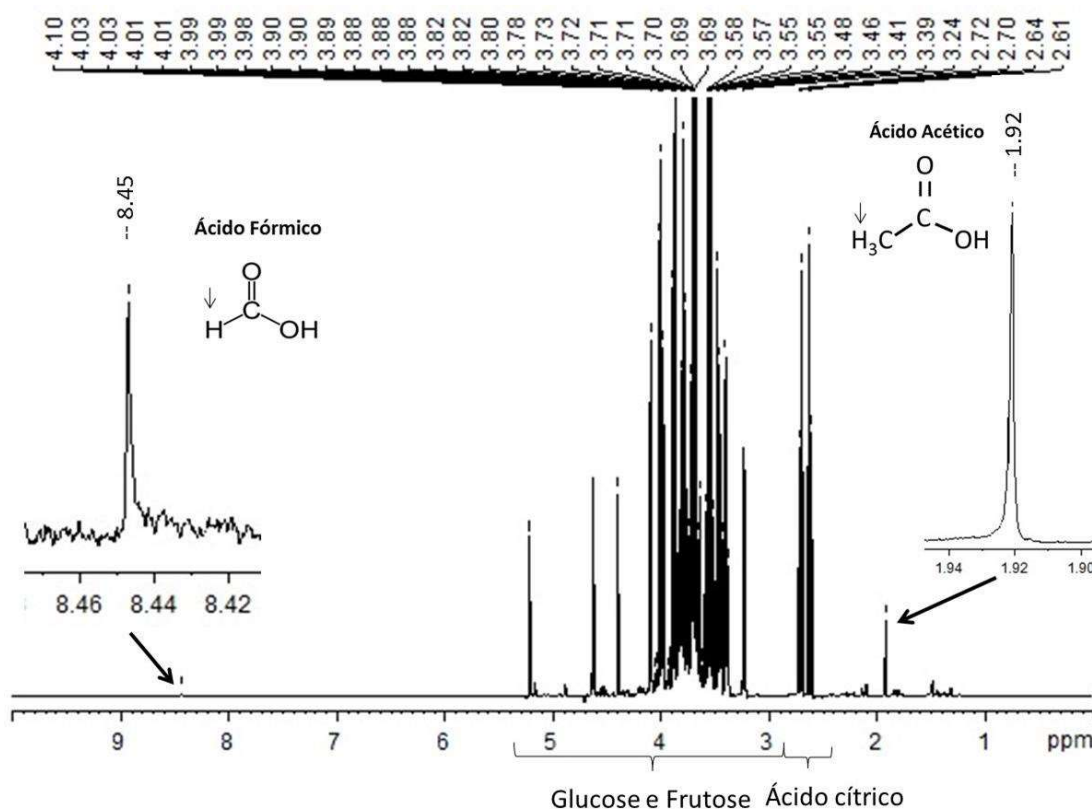


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H da solução similar ao efluente esterilizado. Solução composta por D-glucose, D-frutose e ácido cítrico em água destilada, e esterilizada (121 °C, 21 min) em vial de boro silicato hermeticamente fechado. Após liofilização foi solubilizada (15 mg) em 0,5 mL de D_2O . RMN realizado a 400 Mhz e 30 °C, espectro calibrado com base no deslocamento químico da água.

Foi observado neste último ensaio que a intensidade do deslocamento químico do ácido acético (metila, 3H) é superior em relação ao do ácido fórmico (1H). Esta diferença pode ser explicada pelo maior número de hidrogênios presentes no ácido acético, bem como

pela maior proporção de ácido formado, uma vez que em diferentes estudos foi demonstrado que a síntese do ácido acético é superior em relação ao fórmico. Fang e colaboradores (2012) propuseram um modelo de termo-hidrólise em duas etapas para a produção de ácido acético a partir de glucose e frutose e identificaram a síntese de 11 % de ácido fórmico como subproduto e de 26 % para o produto principal. Limacher e colaboradores (2008) avaliaram a síntese de furano e metilfurano a partir de glucose e frutose através de reações de Maillard. Neste estudo, os autores identificaram a formação dos ácidos acético e fórmico como subprodutos com maior proporção para o ácido acético.

Apesar dos resultados e da literatura indicarem que a produção destes ácidos pode ser proveniente da degradação térmica de carboidratos, as concentrações dos monossacarídeos glucose e frutose dos efluentes bruto e esterilizado não se mostraram significativamente diferentes (Figura 25). Estes resultados estão de acordo com a não detecção de HMF (item 4.5.3), bem como de outros potenciais derivados de açúcares, tais como ácido levulínico e furano no efluente esterilizado. Desta forma, não se descarta a possibilidade de degradação térmica de outros compostos como ácidos graxos e carotenoides, como já mencionado anteriormente.

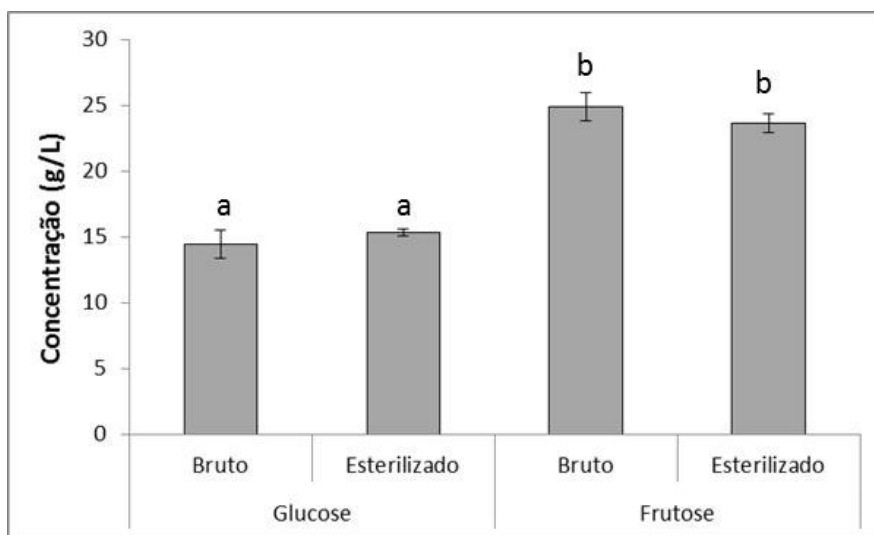


Figura 25. Concentrações de glucose e frutose nos efluentes bruto e esterilizado. Efluente coletado em agosto/2014. Esterilização realizada a 121 °C por 21 min. Quantificação dos monossacarídeos realizada por HPAEC-PAD. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios entre os tratamentos bruto e esterilizado sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % pelo teste t de Student. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

4.6 Avaliação dos métodos para descontaminação microbiana do efluente

Devido à inibição do crescimento de *H. hydrothermalis* no efluente esterilizado e à presença de grande carga microbiana no efluente bruto, se fez necessária a busca por métodos alternativos para a descontaminação do efluente. Dentre as possíveis metodologias, foram escolhidas a calagem e a pasteurização devido ao baixo custo, facilidade operacional, além de serem métodos reconhecidos e aplicados em diferentes processos industriais.

A pasteurização é um processo físico amplamente utilizado na indústria alimentícia com o objetivo de reduzir a carga microbiana e consequentemente aumentar o tempo de prateleira dos produtos. Este processo leva em consideração o aumento da temperatura por um tempo pré-determinado, sendo a temperatura e o tempo duas variáveis dependentes das características físico-químicas do produto e, também, da carga microbiana presente (HARRINGTON; KARLSON, 1965; FERNANDES *et al.*, 2015). De uma forma geral para os processos tradicionais de pasteurização, a temperatura é inferior à temperatura de esterilização como forma de manter as características físico-químicas originais do produto.

O processo de calagem possui como princípio a ação do óxido de cálcio (CaO) sob aquecimento brando com a formação de agregados juntamente às partículas presentes no líquido, em seguida, estes agregados são removidos do líquido através da precipitação durante o resfriamento (DOHERTY, 2011). Desta forma, os micro-organismos suspensos são inativados pelo aquecimento e/ou removidos para fora do líquido juntamente com as partículas. Esta metodologia é utilizada em usinas sucroalcooleiras na clarificação de caldo de cana durante a produção de açúcar. Este processo possui como finalidade a remoção de partículas suspensas e moléculas de alto peso molecular para preparar o caldo para as etapas seguintes da produção (THAI *et al.*, 2015).

Os efluentes pós-tratamento foram avaliados quanto à eliminação da microbiota nativa através da inoculação de uma alíquota nos meios ágar nutriente e ágar malte levedura para o crescimento de bactérias e leveduras/bolores, respectivamente. Na Figura 26D é possível observar que o efluente possui alta carga microbiana para ambos meios. Esta característica pode ser explicada devido ao fato de que as frutas, verduras e legumes são provenientes diretamente do produtor sem tratamento prévio de descontaminação. Além disto, os compactadores utilizados são sistemas abertos e sem limpeza efetiva constante.

Como já esperado, nos tratamentos que utilizaram a esterilização, foi possível eliminar por completo a microbiota do efluente (Figuras 26B, 27B e 28B), enquanto a pasteurização se mostrou ineficiente para este propósito, permitindo a manutenção de micro-organismos

viáveis em todas as condições testadas (Figuras 26A, 27A e 28A). Entretanto, quando a pasteurização foi associada à correção de pH com Ca(OH)_2 , pode-se observar expressiva redução da microbiota, porém, com algumas colônias contaminantes ainda presentes (Figura 28A). Já nos tratamentos que utilizaram o aquecimento por vapor fluente (105 °C, tempos de 10, 20 ou 30 min), os micro-organismos foram completamente inativados e ou removidos do efluente (Figuras 26C, 27C, 28C, 28D e 28E). Portanto, este último método se mostrou mais eficiente para redução da microbiota em relação ao processo de pasteurização com resultados semelhantes à esterilização, porém, utilizando temperaturas inferiores.

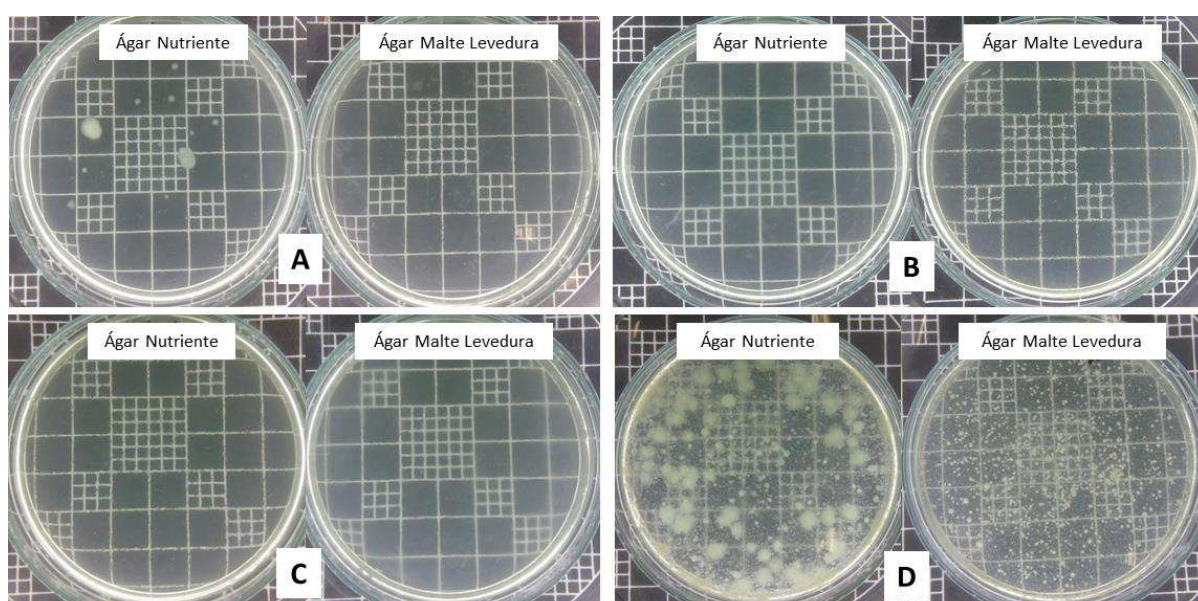


Figura 26. Avaliação da redução da carga microbiana no efluente (A) Pasteurizado, (B) esterilizado, (C) tratado com vapor fluente (105 °C por 20 min) e (D) sem tratamento. Análise realizada utilizando 200 µL dos efluentes tratados e incubados por 24 h a 30 °C.

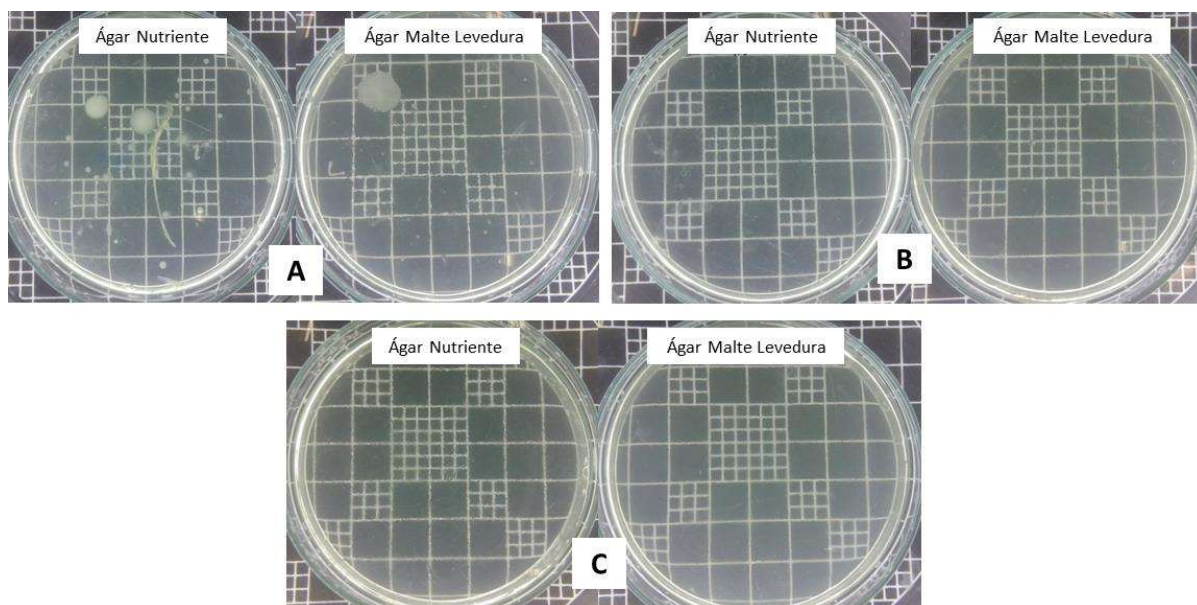


Figura 27. Avaliação da redução da carga microbiana nos tratamentos com pH corrigido com NaOH e (A) Pasteurizado; (B) Esterilizado; e (C) Vapor fluente (105 °C por 20 min). Análise realizada utilizando 200 µL dos efluentes tratados e incubados por 24 h a 30 °C.

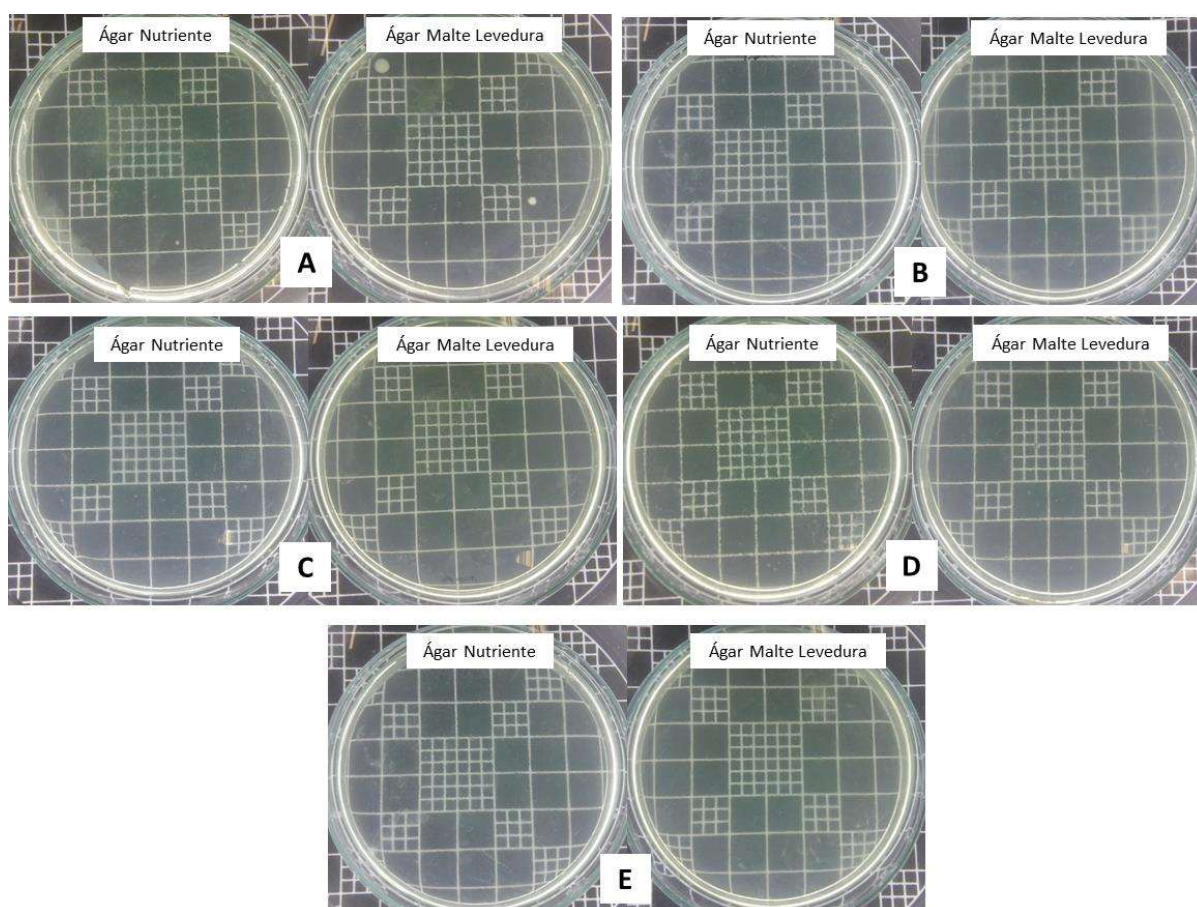


Figura 28. Avaliação da redução da carga microbiana nos tratamentos utilizando calagem e (A) Pasteurização; (B) Esterilização; (C) Vapor fluente (105 °C por 10 min); (D) Vapor fluente (105 °C por 20 min); e (E) Vapor fluente (105 °C por 30 min). Análise realizada utilizando 200 µL dos efluentes tratados e incubados por 24 h a 30 °C.

Além da eliminação da microbiota nativa, outros dois indicadores foram escolhidos para avaliar a eficiência dos processos de descontaminação, sendo eles os valores de pH e grau Brix do efluente pós-tratamento. Estas escolhas foram baseadas no valor de pH para o crescimento ótimo do organismo em estudo e na manutenção dos sólidos solúveis (carboidratos) do efluente. Na Tabela 9 pode-se observar os valores de grau Brix e pH para os diferentes tratamentos testados. Em todos os efluentes que tiveram o pH corrigido com hidróxido de sódio, juntamente com o tratado por calagem e esterilização (CT/ET) apresentaram redução drástica do pH, enquanto os tratamentos denominados de “bruto” e os demais que passaram pelo processo de calagem apresentaram aumento do pH. Em relação aos valores de grau Brix, as únicas alterações foram percebidas nos efluentes esterilizados que tiveram um leve aumento deste valor. Estes resultados podem ser atribuídos à evaporação de líquido durante a esterilização e concentração dos sólidos solúveis.

Tabela 9. Valores de grau Brix e pH pré e pós-tratamentos para descontaminação do efluente

Tratamentos	°Brix pré	°Brix pós	pH pré	pH pós
Bruto*	8,0	-	4,30	-
TT/PT – (70°C/30min)	8,0	8,0	4,30	4,53
TT/VF - (105 °C/20 min)	8,0	8,0	4,30	4,63
TT/ET - (121 °C/21 min)	8,0	8,5	4,30	4,58
TpH/PT - (70°C/30 min)	8,0	8,0	7,23	6,74
TpH/VF - (105 °C/20 min)	8,0	8,0	7,25	6,87
TpH/ET - (121 °C/21 min)	8,0	8,5	7,23	6,19
CT/PT - (70 °C/30 min)	8,0	8,0	7,24	7,35
CT/VF – (105 °C/10 min)	8,0	8,0	7,22	7,85
CT/VF – (105 °C/20 min)	8,0	8,0	7,23	7,67
CT/VF – (105 °C/30 min)	8,0	8,0	7,24	7,45
CT/ET- (121 °C/21 min)	8,0	8,5	7,22	6,70

*Bruto: Efluente sem correção de pH; TT: Tratamento térmico; TpH: Correção do pH utilizando hidróxido de sódio microporolado; CT: Correção do pH utilizando hidróxido de cálcio na concentração de 14 °Baumé; PT: Pasteurização; VF: Aquecimento efetuado por meio de vapor fluente.

Com base nos resultados obtidos, o tratamento CT/VF – (105°C/20 min) foi escolhido como forma de tratamento do efluente para os testes futuros de crescimento celular e produção de P(3HB). Este tratamento foi escolhido por apresentar pH final próximo ao ideal para o crescimento da bactéria de estudo, pela redução da microbiota nativa e pelo tempo intermediário de tratamento utilizando a calagem. Este tratamento foi denominado de CA20 de forma a facilitar o entendimento dos próximos resultados.

As produções de biomassa e P(3HB) foram testadas utilizando o efluente tratado na

condição denominada de CA20 e comparadas aos resultados obtidos com o mesmo lote de efluente esterilizado. A partir dos resultados, foi observado que, utilizando o novo tratamento não houve inibição do crescimento celular, além do aumento da concentração de biomassa em aproximadamente 2 g/L utilizando o efluente concentrado (Figura 29).

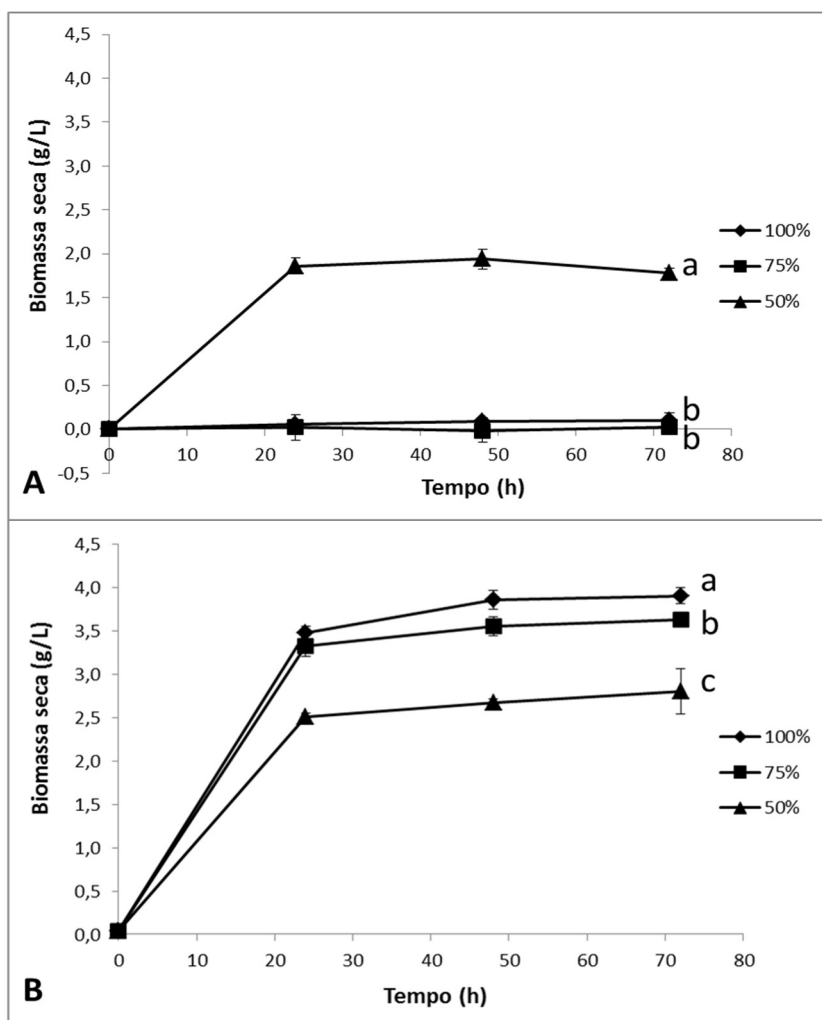


Figura 29. Comparação do crescimento celular utilizando efluente esterilizado (A) ou tratamento CA20 (B). Ensaio realizado utilizando efluente nas concentrações de 100, 75 e 50 % com diluições em água destilada. Cultivo realizado a 30 °C, 160 rpm, amostras em triplicata para cada tempo e concentração. Biomassa recuperada por centrifugação a 4300 x g por 10 min, seguido de liofilização. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % através do teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

Apesar de não ocorrer a inibição do crescimento celular e do aumento da concentração de biomassa utilizando o tratamento CA20, houve uma redução significativa nas concentrações de P(3HB) intracelular (Figura 30). Uma das hipóteses que explica estes resultados está correlacionada com a precipitação de compostos orgânicos presentes no efluente, possivelmente utilizados como fontes de nutrientes para este fim.

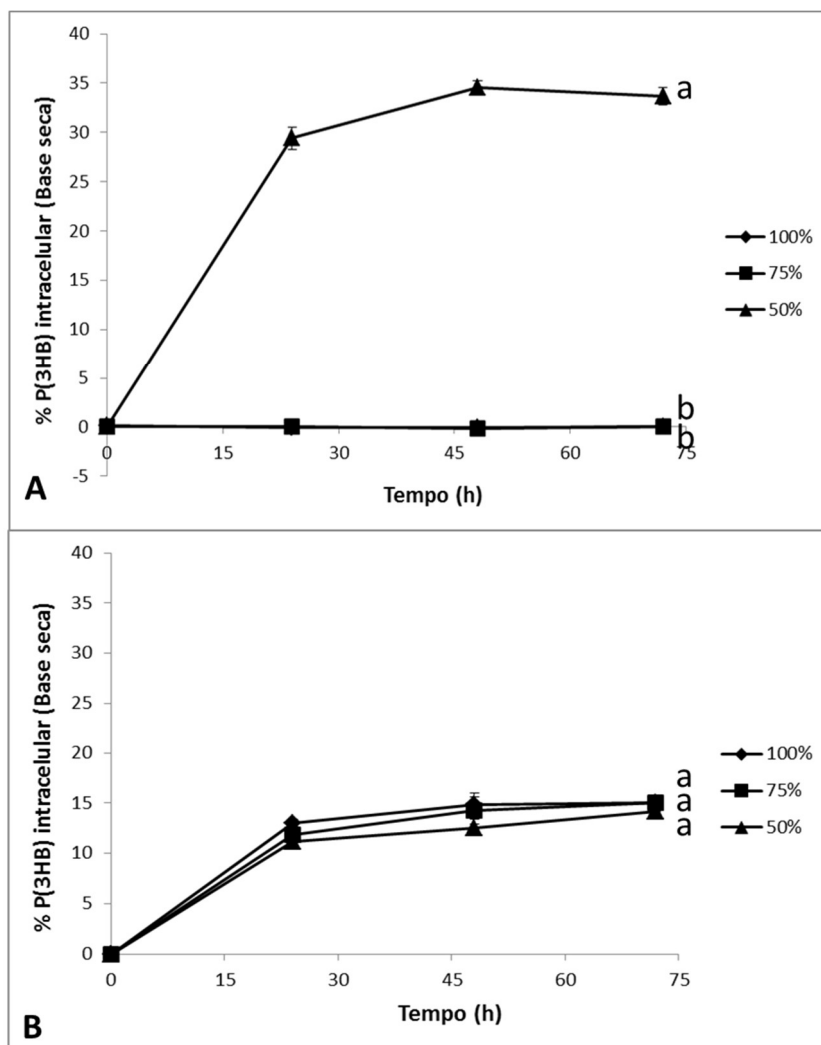


Figura 30. Concentração de P(3HB) intracelular dos cultivos utilizando efluente esterilizado (A) e tratado CA20 (B). Ensaios realizados utilizando efluente nas concentrações de 100, 75 e 50 % com diluições em água destilada. Amostras realizadas em triplicata para cada tempo e concentração. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % através do teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

O efeito da redução na produção de P(3HB) é visualizado de forma mais efetiva quando é levada em consideração a produção do biopolímero por volume de efluente utilizado. Desta forma descartam-se possíveis falsas interpretações geradas devido ao aumento da biomassa proveniente do tratamento CA20 (Figura 31). Utilizando esta estratégia, foi observado que no efluente esterilizado e diluído a 50 % (v/v) obteve-se produção máxima de P(3HB), superior a 0,8 g/L em 48 h, enquanto no tratamento CA20, a produção máxima foi de 0,6 g/L no mesmo tempo de cultivo.

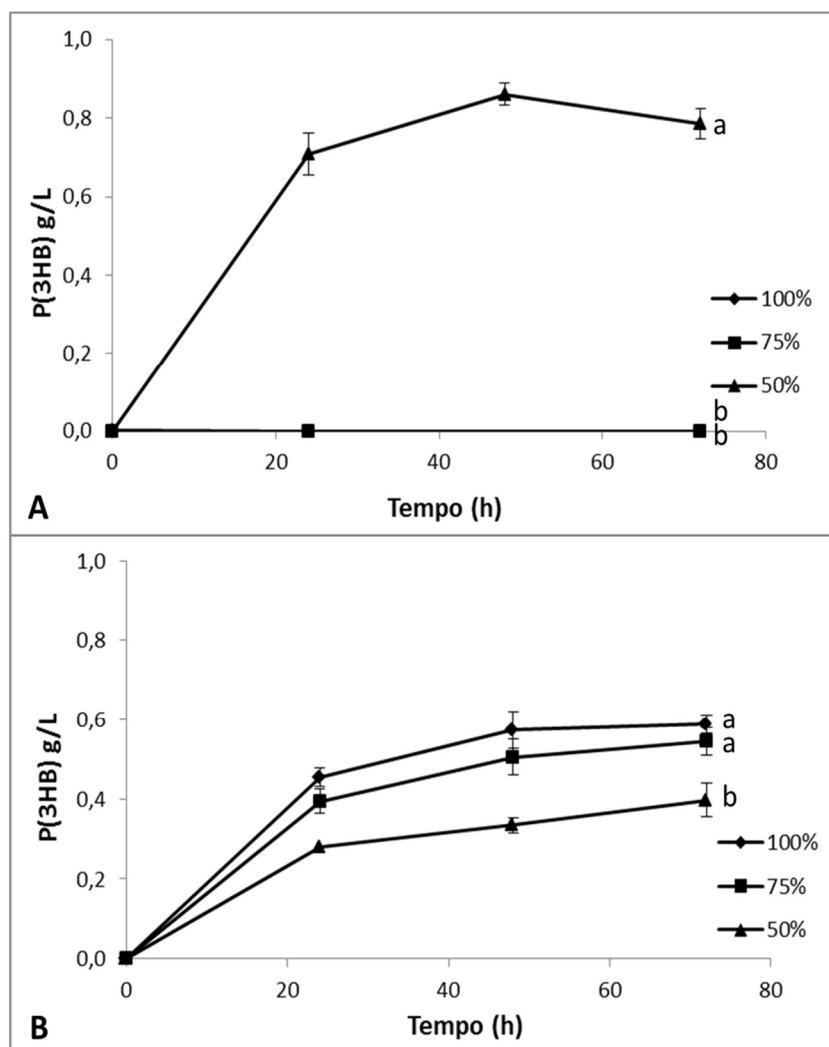


Figura 31. Concentração de P(3HB) nos cultivos utilizando os efluentes esterilizado (A) e tratado CA20 (B). Ensaio realizado utilizando efluente nas concentrações de 100, 75 e 50 % com diluições em água destilada. Amostras realizadas em triplicata para cada tempo e concentração. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % através do teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

Levando em consideração os resultados de produção de P(3HB), o aumento do tempo e das etapas necessárias para o tratamento do efluente através da calagem, foi estipulado que o efluente esterilizado na concentração de 50 % (v/v) é mais efetivo para a produção do biopolímero. Porém, outras estratégias como a remoção dos inibidores poderiam auxiliar a produção de biomassa favorecendo o uso do efluente no bioprocessamento.

4.7 Avaliação dos métodos de destoxificação do efluente

Devido à formação dos ácidos acético e fórmico durante a esterilização do efluente,

foram testados dois métodos de destoxificação do efluente visando melhorar o crescimento microbiano. Dentre os métodos existentes, a destoxificação por *overliming* e por carvão ativado são amplamente utilizadas na remoção de compostos tóxicos formados durante a hidrólise ácida de biomassa celulósica (CANILHA *et al.*, 2012; JÖNSSON *et al.*, 2013). As estratégias de destoxificação foram escolhidas com base na simplicidade, baixo custo operacional e eficiência de remoção para os compostos tóxicos identificados no efluente esterilizado. As técnicas de destoxificação por *overliming* ou carvão ativado consistem na homogeneização da solução a ser destoxificada com Ca(OH)_2 ou carvão ativado, respectivamente. Estas técnicas possuem como princípio de funcionamento a precipitação ou desestabilização dos compostos tóxicos através do *overliming* ou adsorção destes compostos pelo carvão ativado (RANATUNGA *et al.*, 2000; VAN ZYL *et al.*, 1988; CANILHA *et al.*, 2012).

Os dois tratamentos de destoxificação utilizados apresentaram efeito positivo no crescimento celular quando comparados ao efluente esterilizado tanto na forma concentrada ou diluída (Figura 32). A partir destes tratamentos, foi possível obter concentrações de biomassa no mínimo 1 g/L superiores ao método até então proposto.

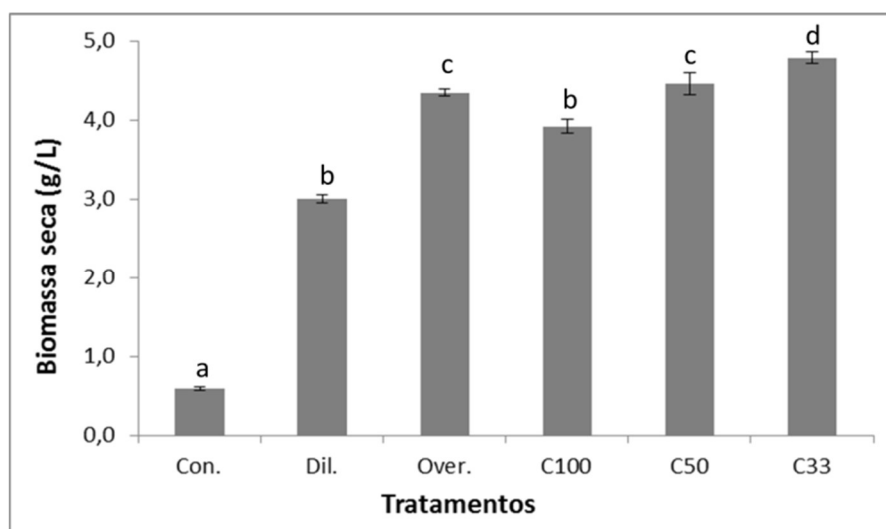


Figura 32. Avaliação do crescimento celular no efluente destoxificado por *overliming* (Over.) ou carvão ativado nas concentrações de 100 g/L (C100), 50 g/L (C50) e 33 g/L (C33). Efluente esterilizado concentrado (Con.) e diluído na proporção de 50 % (v/v) (Dil.). Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % através do teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

Apesar dos resultados superiores de biomassa seca para os tratamentos utilizando carvão ativado (C100, C50 e C33), foram identificados problemas na remoção do carvão

ativado e redução nos valores dos açúcares redutores do efluente após o tratamento. Desta forma, o tratamento utilizando a destoxificação por *overliming* se mostrou mais eficiente para o processamento do efluente. Porém, como forma de verificar se o efeito do tratamento por *overliming* está associado à destoxificação ou apenas ao ajuste do pH através da adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, foi realizado um experimento comparando os tratamentos de destoxificação por *overliming*, efluente esterilizado diluído 50 % (v/v) e efluente esterilizado concentrado com correção de pH para 7,5 utilizando NaOH 5 M após a esterilização. Os cultivos foram realizados em triplicata a 30 °C e 160 rpm, totalizando 72 h de cultivo com amostras coletadas a cada 24 h (Figura 33).

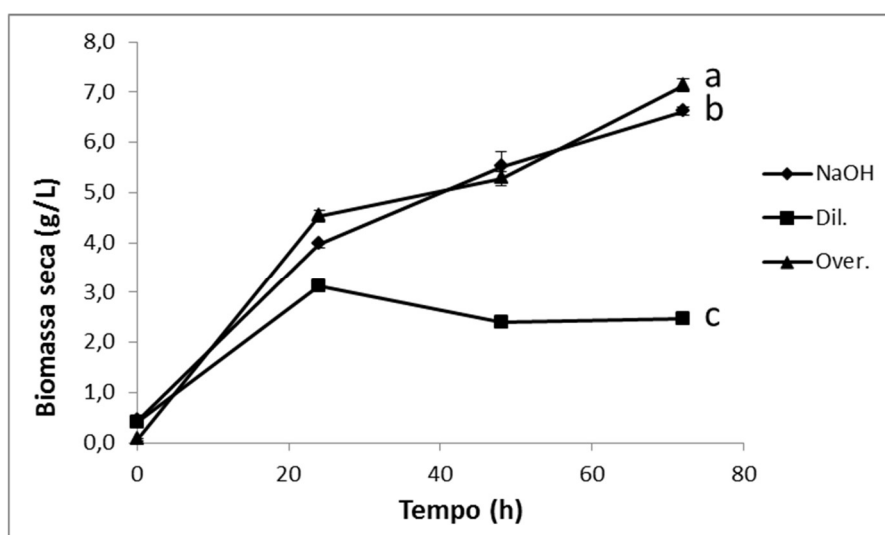


Figura 33. Efeito da correção do pH com NaOH na produção de biomassa com o efluente esterilizado. Efluente esterilizado a 121 °C por 21 min. Tratamentos: *overliming* (Over.), diluição a 50 % (v/v) com água destilada (Dil.) e correção do pH para 7,5 com NaOH 5 M (NaOH). Cultivos realizados em triplicata a 30°C e 160 rpm. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % através do teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

A partir desta avaliação, foi observado que a correção do pH com NaOH após a esterilização exerce efeito semelhante ao *overliming* no crescimento celular, enquanto que a diluição do efluente em água destilada reduz o crescimento em mais de 50 % (Figura 33). Os resultados observados para o tratamento utilizando NaOH 5 M foram diferentes dos dados inicialmente obtidos no projeto (fev/2013). Nos experimentos iniciais, havia inibição do crescimento microbiano mesmo com a correção do pH para 7,5 com NaOH após a esterilização. Esta diferença nos resultados provavelmente se deve ao lote de efluente que foi utilizado nos experimentos iniciais, uma vez que, os demais lotes coletados não apresentaram comportamento inibitório após a correção do pH com NaOH no efluente esterilizado (Figura

34). Desta forma, este tratamento se mostrou mais eficiente em relação aos demais devido à praticidade de operação. Com base nos resultados demonstrados e discutidos, os ensaios de avaliação da produção de P(3HB) foram realizados com o efluente esterilizado em autoclave a 121°C por 21 min seguido de correção do pH para 7,5 com NaOH 5 M.

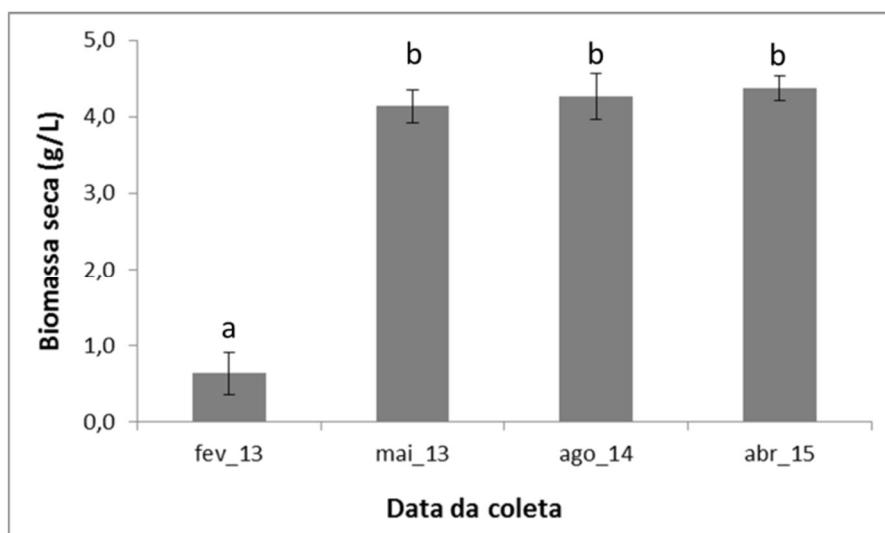


Figura 34. Avaliação do crescimento de *H. hydrothermalis* utilizando os diferentes lotes de efluentes coletados. Efluentes esterilizados a 121 °C por 21 min seguido de correção de pH para 7,5 com NaOH 5 M. Cultivos realizados em triplicata a 30 °C e 160 rpm por 24 h. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % comparando as médias par a par pelo teste t de Student. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

4.8 Influência dos ácidos acético, cítrico e fórmico na produção de poli(3-hidroxibutirato)

A influência dos ácidos acético, cítrico e fórmico na produção de P(3HB) foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo. A técnica permite quantificar a emissão de fluorescência do corante vermelho do Nilo ao se ligar aos grânulos intracelulares do polímero (SPIEKERMANN *et al.*, 1999). Esta técnica foi padronizada por Alves e colaboradores (2017) e é empregada na avaliação da produção de P(3HB) por diferentes micro-organismos. O fator determinante na escolha da técnica de citometria de fluxo foi a possibilidade de realizar os ensaios com baixa concentração celular, uma vez que o cultivo em meio mínimo M9 utilizando fontes de nitrogênio inorgânicas não permite o crescimento celular em alta concentração, condição necessária para poder quantificar o P(3HB) por método gravimétrico (metodologia utilizada nas etapas anteriores).

Previamente à análise, foi necessário comprovar a eficiência do método de citometria

de fluxo para avaliar a produção de P(3HB) em *H. hydrothermalis*, pois a eficiência e as condições de trabalho da técnica podem mudar conforme o micro-organismo utilizado. A avaliação foi realizada cultivando o micro-organismo em duas condições distintas: não favorável ao acúmulo do biopolímero utilizando meio de cultivo Luria Bertani P(3HB)- e favorável, utilizando o efluente como meio de cultivo P(3HB)+. Verificou-se que a técnica empregada permite a diferenciação das duas condições P(3HB)- e P(3HB)+ em *H. hydrothermalis* (Figura 35). Esta diferenciação pode ser verificada pela formação de dois picos únicos e com bom deslocamento entre si e, também, através dos valores de fluorescência para as duas condições sendo, eles de 8798 para a condição P(3HB)- e 61173 para a condição P(3HB)+ (valores de fluorescência dados em unidades arbitrárias).

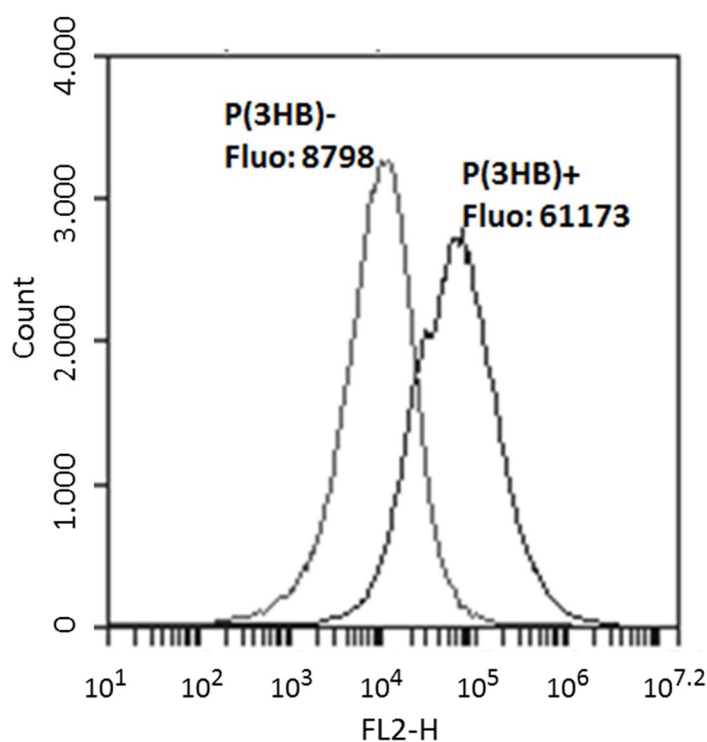


Figura 35. Avaliação da técnica de citometria de fluxo para a identificação de P(3HB) em *H. hydrothermalis*. Análise realizada utilizando células cultivadas em meio Luria Bertani P(3HB)- e em meio de cultivo composto pelo efluente em estudo P(3HB)+.

Com relação ao efeito do acetato, citrato e formiato no crescimento celular, foi observado que a condição contendo acetato (GA) estimulou a produção de biomassa quando comparada às demais condições (Figura 36). Nos meios contendo citrato (GC) ou formiato (GF), o desenvolvimento foi inferior ao controle contendo apenas glucose (G). A redução observada pode ser atribuída ao fato de que nestes cultivos a fonte de carbono foi substituída em aproximadamente 60 % por citrato ou formiato, indicando que estas duas substâncias não

foram utilizadas para formação de biomassa.

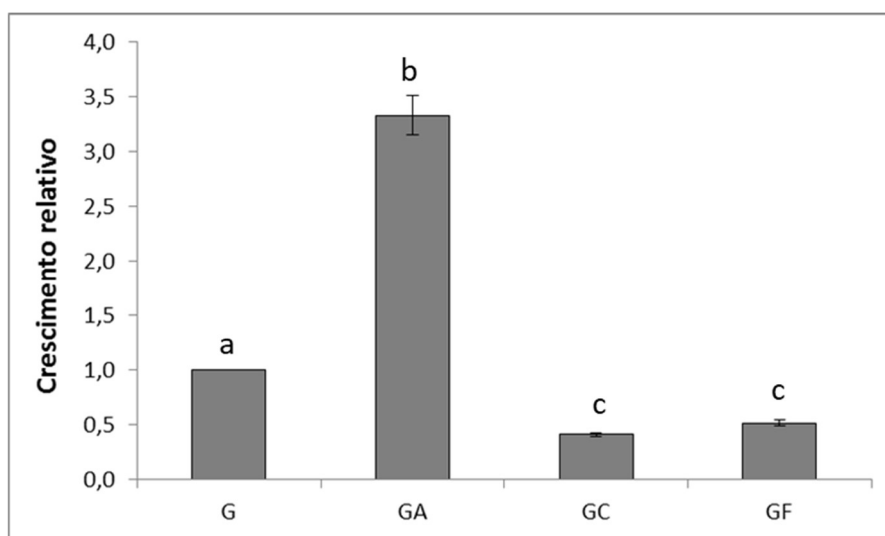


Figura 36. Crescimento relativo da bactéria utilizando acetato, citrato e formiato como fonte de carbono. Concentrações de carbono semelhantes para todos os tratamentos: (G) - glucose a 4 g/L-C; (GA) - glucose a 1,66 g/L-C e acetato de sódio a 2,34 g/L-C; GC - glucose a 1,66 g/L-C e citrato de sódio a 2,34 g/L-C; GF - glucose a 1,66 g/L-C e formiato de sódio a 2,34 g/L-C. Cultivo realizado em meio M9 a 30 °C e 160 rpm, densidade óptica em 600 nm obtida após 24 h de cultivo. Valores de crescimento dos tratamentos GA, GC e GF normalizados pelo tratamento G. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % através do teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

Kaye e colaboradores (2004) relatam o crescimento de *H. hydrothermalis* utilizando acetato e citrato como fonte de carbono, porém, sem realizar a comparação do crescimento celular nestas condições. Weissgram e colaboradores (2015) observaram o crescimento de *H. halophila* na presença dos ácidos acético e fórmico nas concentrações de 5,33 g/L e 157 mg/L respectivamente. Porém, no trabalho realizado por Qu e colaboradores (2011) foi relatado que a bactéria *Halomonas daqiaonensis* sp. nov não possui a capacidade de utilizar formiato como fonte de carbono. Sendo assim, demonstra-se que, para a bactéria estudada, o formiato não possui a capacidade de reduzir o crescimento celular por completo, assim como já relatado para o citrato.

A suplementação do meio com acetato proporcionou, além do crescimento celular, o estímulo da produção de P(3HB), sendo esta muito superior aos tratamentos compostos por apenas glucose ou suplementados com citrato e formiato (Figura 37). As fluorescências obtidas nos tratamentos G, GC e GF podem ser consideradas como basais para o micro-organismo, uma vez que foram próximas ao valor obtido para o controle negativo nos cultivos em meio LB. Portanto, os resultados indicam que estas fontes de carbono não são utilizadas

para a produção do biopolímero na condição testada.

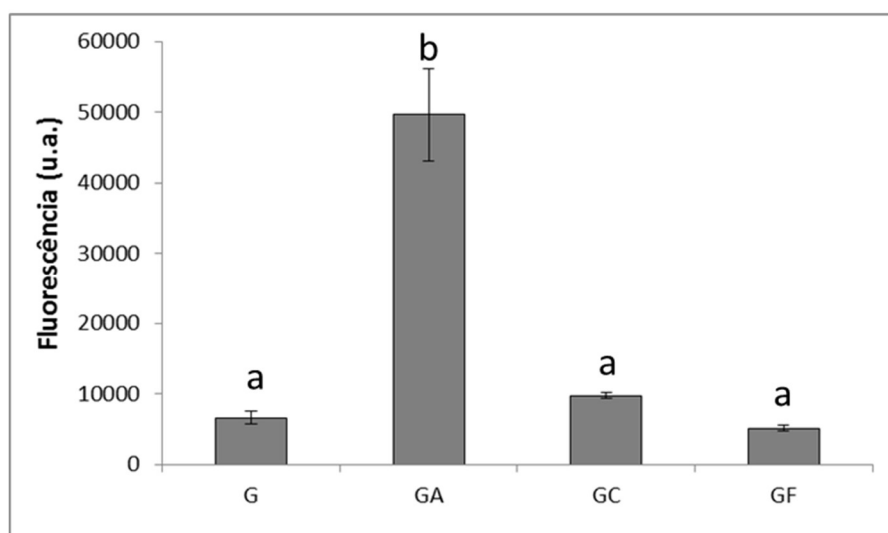


Figura 37. Avaliação da produção de P(3HB) utilizando acetato, citrato e formiato como suplementação da fonte de carbono. Concentrações de carbono semelhantes para todos os tratamentos: (G) - glucose a 4 g/L-C; (GA) - glucose a 1,66 g/L-C e acetato de sódio a 2,34 g/L-C; GC - glucose a 1,66 g/L-C e citrato de sódio a 2,34 g/L-C; GF - glucose a 1,66 g/L-C e formiato de sódio a 2,34 g/L-C. Análise realizada por citometria de fluxo utilizando o corante vermelho do Nilo. Dados coletados no filtro FL2-H (585/40 nm) referentes a 100 mil eventos. Fluorescência fornecida em unidades arbitrárias (u.a.). Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % através do teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

Bera e colaboradores (2015) avaliaram a produção de P(3HB) por *H. hydrothermalis* MTCC5445 utilizando o hidrolisado de κ -carragenana contendo ácido fórmico na composição. Neste estudo, os autores relatam que o hidrolisado foi eficiente na produção do biopolímero, porém, sem descrever a concentração do ácido no hidrolisado ou o efeito desta substância de forma isolada na produção de P(3HB). Até o momento da redação deste manuscrito, não existiam outros relatos do uso dos ácidos fórmico ou cítrico como fonte de carbono na produção de P(3HB) pelo organismo em estudo. Porém, para a bactéria *Ralstonia eutropha*, os trabalhos de Grunwald e colaboradores (2015) e Hafuka e colaboradores (2011) indicam o efeito positivo do ácido fórmico para a produção deste biopolímero.

De forma a verificar o efeito de diferentes concentrações de acetato no crescimento bacteriano e na produção de P(3HB), foi realizado um teste de forma similar aos anteriores, porém, variando as proporções entre glucose e acetato. Com este ensaio, foi observado que o aumento da concentração de acetato na presença de glucose estimula a produção de biomassa, porém, quando utilizado como única fonte de carbono, o efeito é inferior à glucose (Figura 38). Nos tratamentos GA 2 e GA 5, que apresentam as maiores concentrações de acetato, o

efeito no crescimento celular foi estatisticamente semelhante. Isto pode ser decorrente da chegada do cultivo em fase estacionária devido à redução drástica de algum outro nutriente, como por exemplo, o nitrogênio.

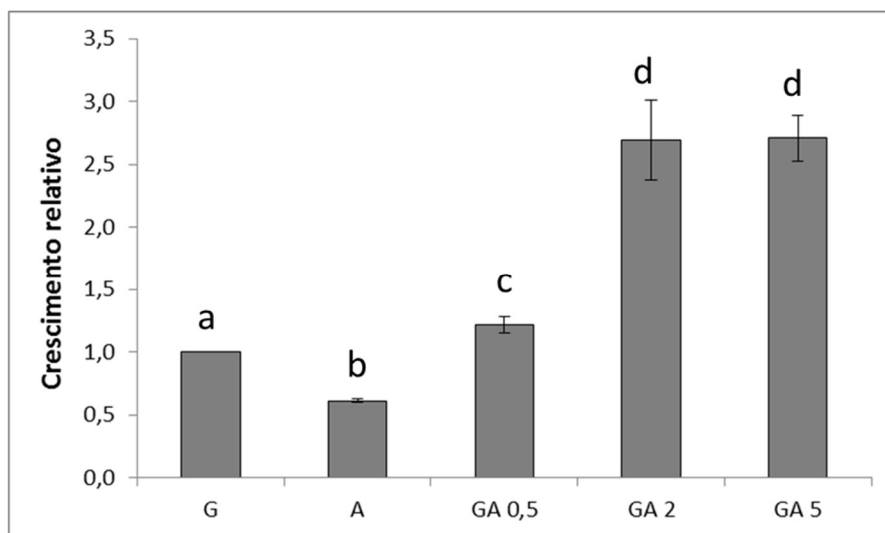


Figura 38. Crescimento relativo de *H. hydrothermalis* em diferentes concentrações de acetato. (G) - glucose a 2 g/L-C; (A) – acetato de sódio a 2 g/L-C; (GA 0,5) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 0,5 g/L-C; (GA 2) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 2 g/L-C; (GA 5) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 5 g/L-C. Cultivo realizado em meio M9 a 30 °C e 160 rpm, densidade óptica em 600 nm obtida após 24 h de cultivo. Valores de crescimento dos tratamentos GA, GC e GF normalizados pelo tratamento G. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % comparando as médias par a par pelo teste t de Student. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

Como anteriormente discutido, a produção de P(3HB) é estimulada pela presença de acetato no meio de cultivo. O incremento na produção de P(3HB) em função da concentração de acetato se mostrou dose dependente nas concentrações e condições testadas (Figura 39). Para a condição contendo apenas glucose (G), a fluorescência se mostrou basal, assim como nos ensaios anteriores, indicando que não ocorre a produção de P(3HB) quando esta substância está presente como única fonte de carbono. No tratamento composto por apenas acetato (A), a fluorescência se mostrou similar ao tratamento contendo glucose mais acetato na concentração de 0,5 g/L-C (GA 0,5), indicando, desta forma, a produção do biopolímero. A produção de P(3HB) nesta condição pode explicar o menor crescimento celular observado neste tratamento (Figura 38), pois quando o acetato está presente como única fonte de energia, parte desta fonte é direcionada para a produção do biopolímero, reduzindo assim a disponibilidade para a formação de biomassa (BABEL *et al.*, 2001).

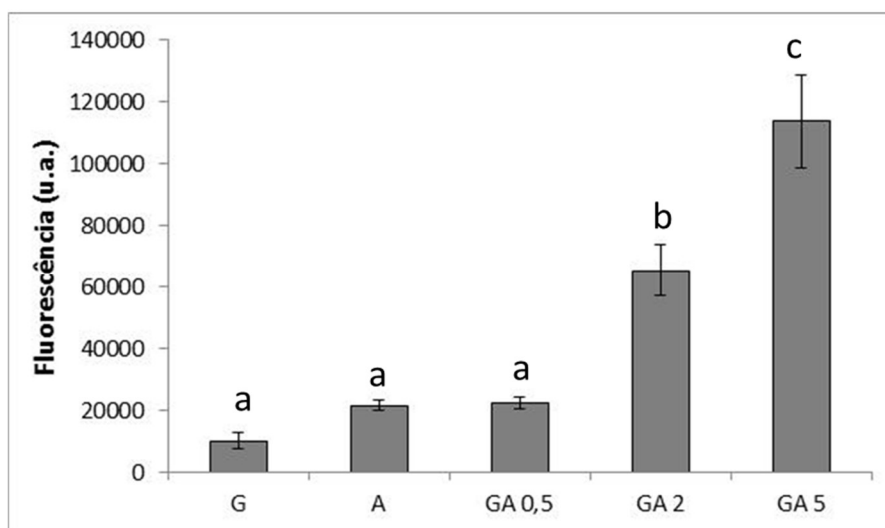


Figura 39. Efeito da concentração de acetato na produção de P(3HB). (G) - glucose a 2 g/L-C; (A) – acetato de sódio a 2 g/L-C; (GA 0,5) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 0,5 g/L-C; (GA 2) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 2 g/L-C; (GA 5) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 5 g/L-C. Análise realizada por citometria de fluxo utilizando o corante vermelho do Nilo. Dados coletados no filtro FL2-H (585/40 nm) referentes a 100 mil eventos. Fluorescência fornecida em unidades arbitrárias (u.a.). Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % através do teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

A confirmação destes dados foi realizada pela quantificação do P(3HB) intracelular por cromatografia gasosa conforme descrito no item 3.13. Foi observado que, com exceção do tratamento A, a concentração do biopolímero intracelular nas amostras analisadas segue o mesmo padrão encontrado para os valores de fluorescência obtidos nos experimentos de citometria de fluxo (Figura 40). Além disto, pode-se observar que os valores de fluorescência e percentual de P(3HB) intracelular apresentam boa correlação, validando os dados obtidos (Figura 41).

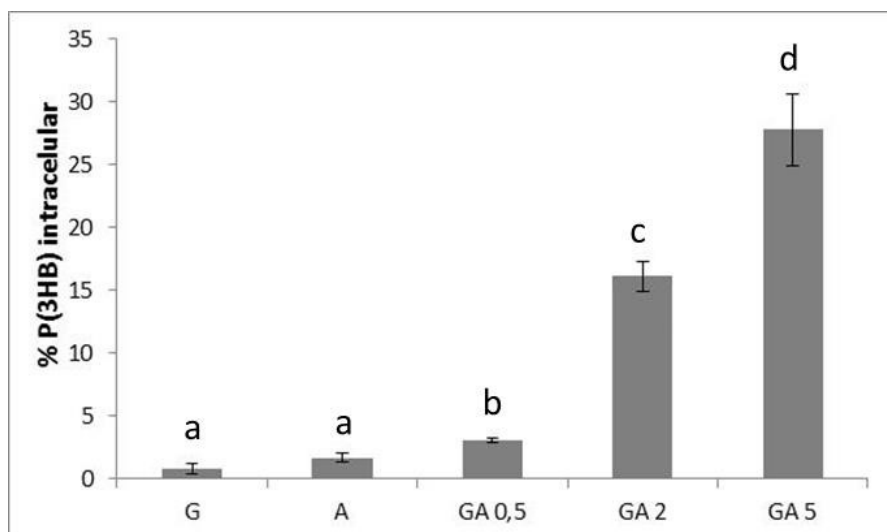


Figura 40. Percentual de P(3HB) intracelular nos diferentes tratamentos. (G) - glucose a 2 g/L-C; (A) – acetato de sódio a 2 g/L-C; (GA 0,5) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 0,5 g/L-C; (GA 2) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 2 g/L-C; (GA 5) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 5 g/L-C. Cultivo realizado em meio M9 a 30 °C e 160 rpm, quantificação realizada após metanólise das amostras. Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesmas letras não diferem significativamente ao nível de 5 % comparando as médias par a par pelo teste t de Student. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

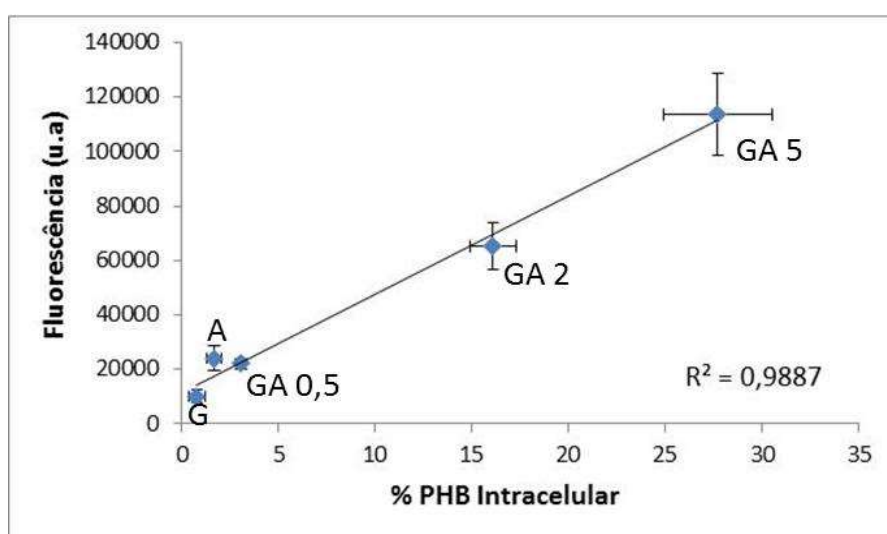


Figura 41. Correlação entre fluorescência e percentual de P(3HB) intracelular nos diferentes tratamentos. (G) - glucose a 2 g/L-C; (A) – acetato de sódio a 2 g/L-C; (GA 0,5) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 0,5 g/L-C; (GA 2) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 2 g/L-C; (GA 5) - glucose a 2 g/L-C e acetato de sódio a 5 g/L-C.

O uso de acetato como fonte de carbono para a produção de P(3HB) já foi relatado por diversos autores, utilizando diferentes micro-organismos. Cui e colaboradores (2016) demonstraram que a suplementação do meio com acetato estimula a produção de PHA em cultura mista halofílica, utilizando a estratégia de alimentação dinâmica aeróbia. Com esta suplementação, foi possível atingir valores próximos de 65 % de PHA em base seca. Marang

e colaboradores (2014) avaliaram a produção de PHA em sistema de reatores em batelada sequenciais utilizando cultura mista, propondo a suplementação do meio com acetato e metanol como forma de reduzir a carga microbiana não produtora de PHA. Xiao e Jiao (2011) observaram que a bactéria aeróbica anoxigênica fototrófica *Dinoroseobacter* sp. JL1447 é capaz de acumular aproximadamente 72 % de P(3HB) em base seca, quando cultivada com acetato. Para os organismos do gênero *Halomonas*, Van-Thuoc e colaboradores (2008) demonstraram que a suplementação do meio com acetato e ácido butírico permite o aumento da concentração intracelular do biopolímero, podendo chegar a 50 % da biomassa seca em *Halomonas boliviensis* LC1.

Durante o metabolismo microbiano, tanto a glucose quanto o acetato são convertidos em acetil-CoA, que pode ser direcionado para o ciclo de Krebs, para a síntese de P(3HB) ou ambos (Figura 42).

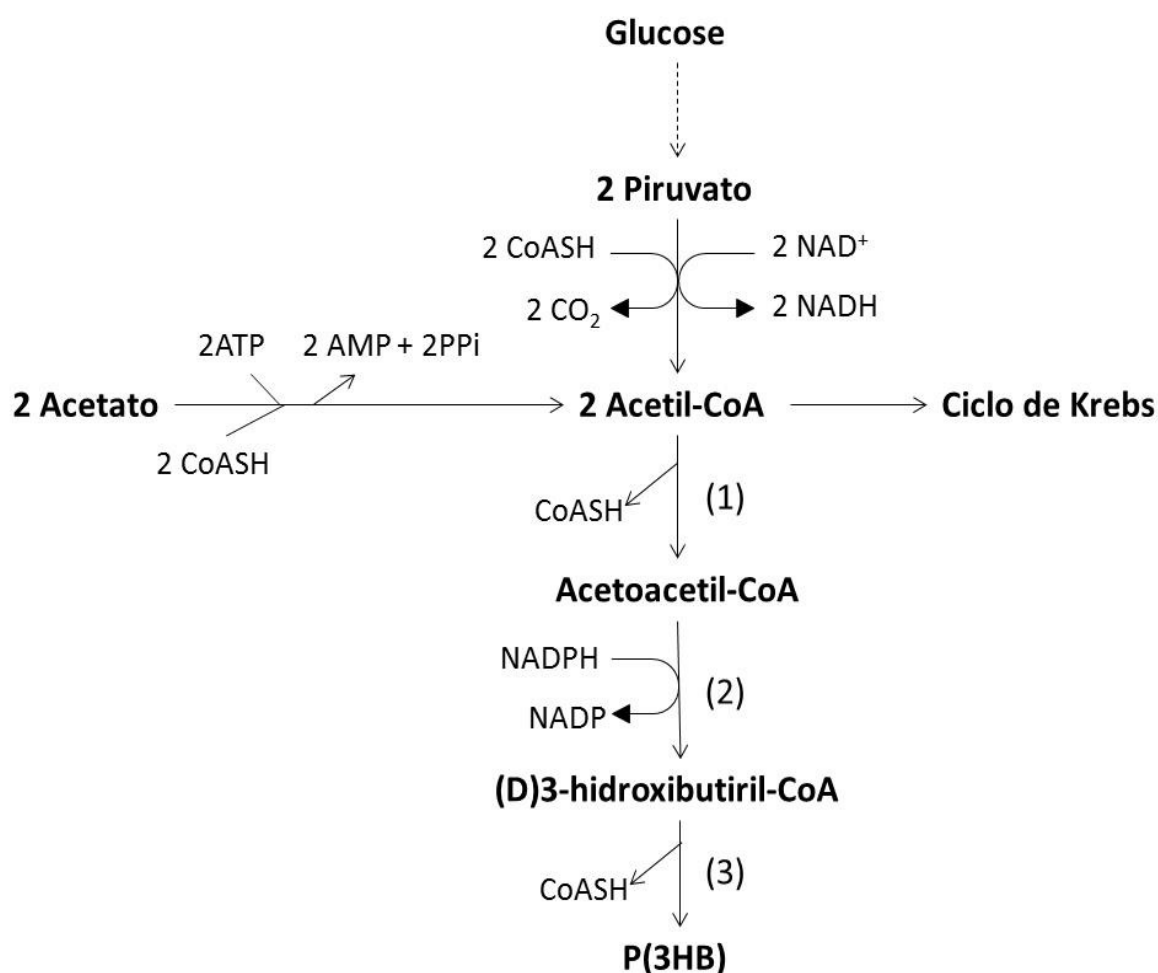


Figura 42. Via metabólica para a produção de P(3HB) a partir de glucose e acetato. Enzimas envolvidas na síntese (1) beta-cetotiolase, (2) acetoacetyl-CoA redutase dependente de NAD(P)H e (3) PHB sintase. Fonte: adaptado de Van-Thuoc *et al.* (2008).

De uma forma geral, a produção do biopolímero está associada, entre outras coisas, à concentração intracelular de NAD(P)H e/ou à relação NAD(P)H/NAD(P) (DAWES; SENIOR, 1973; KUMAR; CHAKRABARTI, 2011). De acordo com Macrae e Wilkinson (1958), para uma máxima conversão da fonte de carbono durante a síntese de P(3HB) deve-se ter uma mistura entre substratos com alto e baixo poder redutor, por exemplo, glucose mais acetato. Quando as concentrações de NAD(P)H e NAD(P) são energeticamente equivalentes, os dois substratos podem ser utilizados para a produção de P(3HB) e altas taxas de conversão podem ser atingidas. Desta forma, o uso de fontes de carbono que forneçam quantidades diferentes de poder redutor pode influenciar positivamente a produção de P(3HB), como visto nos resultados apresentados.

4.9 Efeito da glucose e frutose na produção de poli(3-hidroxibutirato)

Conforme discutido durante a caracterização do efluente (item 4.4), os monossacarídeos glucose e frutose são os compostos majoritários encontrados no efluente. Estes compostos estão presentes em altas concentrações e podem ser responsáveis pela fonte de energia para a produção de P(3HB), conforme já discutido no item 4.5. Dentre estes dois monossacarídeos, a glucose possibilita maior crescimento para a bactéria *H. hydrothermalis* (item 4.2).

A produção de P(3HB) por micro-organismos do gênero *Halomonas* utilizando glucose como fonte de carbono já foi descrita por vários autores (QUILLAGUAMÁN *et al.*, 2006; TAN *et al.*, 2011; GUZMÁN *et al.*, 2012; KAWATA *et al.*, 2013). Porém, os resultados obtidos no presente trabalho (item 4.8) indicam que *H. hydrothermalis* não produz este polímero em condições contendo glucose como única fonte de carbono. De forma a verificar se estes resultados não foram decorrentes de uma limitação de poder redutor, devido à baixa concentração de glucose utilizada, foi realizado um novo experimento fornecendo glucose como única fonte de carbono nas concentrações de 5, 50 e 100 g/L que forneceram respectivamente 2, 20 e 40 g/L-C. A partir deste experimento foi observado que, mesmo em altas concentrações de glucose, a fluorescência foi muito próxima ao basal da célula indicando que a produção de P(3HB) foi similar entre as condições (Figura 43).

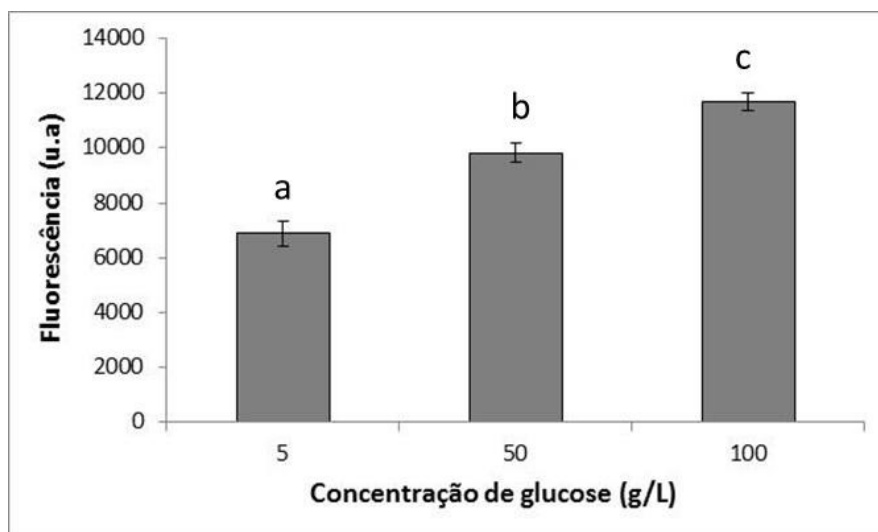


Figura 43. Efeito da concentração de glucose na produção de P(3HB). Análise realizada por citometria de fluxo utilizando o corante vermelho do Nilo. Dados coletados no filtro FL2-H (585/40 nm) referentes a 100 mil eventos. Fluorescência fornecida em unidades arbitrárias (u.a.). Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % através do teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

A produção de P(3HB) utilizando frutose como única fonte de carbono apresenta comportamento similar aos cultivos utilizando apenas glucose como fonte de energia, uma vez que a fluorescência observada é muito baixa, indicando a não produção do biopolímero (Figura 44). Estes resultados são similares aos obtidos quando o organismo é crescido na condição contendo a mistura de glucose e frutose nas concentrações encontradas no efluente. Tan e colaboradores (2014) descreveram a produção de P(HB-co-HV) pela bactéria *Halomonas* TD08 utilizando frutose como única fonte de carbono. De forma similar, Cardinali-Rezende e colaboradores (2016) descrevem que a bactéria *Halomonas* sp.HG01 é capaz de produzir P(3HB) utilizando frutose. Até o presente momento não são relatados maiores estudos que demonstrem e discutam as rotas metabólicas para a produção de P(3HB) em *H. hydrothermalis* utilizando os monossacarídeos avaliados.

Conforme o exposto até o momento, a produção de P(3HB) utilizando o efluente como única fonte de carbono não pode ser associada somente à presença de glucose e frutose, uma vez que outros componentes como acetato, ácidos graxos e até mesmo outras substâncias, que podem estar presentes no efluente em menor concentração e que não foram identificadas, podem exercer grande influência no metabolismo microbiano.

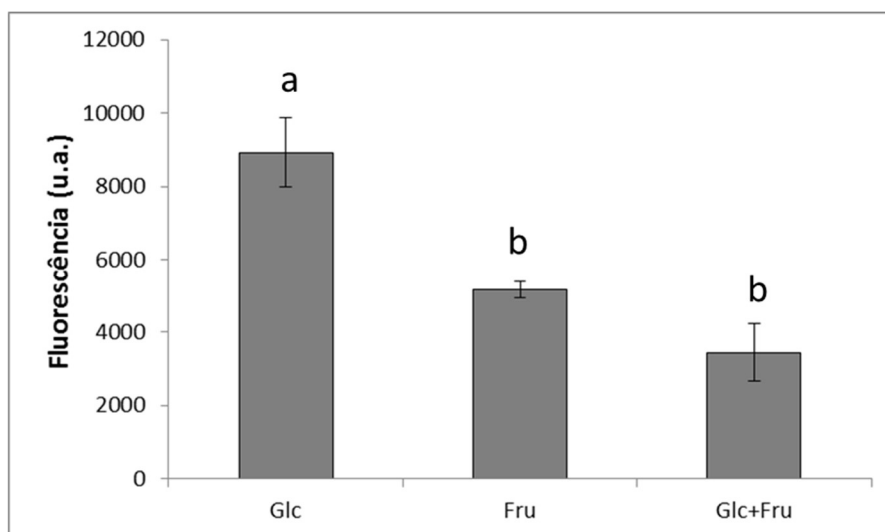


Figura 44. Efeito da glucose [Glc], frutose [Fru] e da mistura frutose mais glucose [Glc+Fru] na produção de P(3HB). Tratamento Glu+Fru com concentrações dos monossacarídeos similares as encontradas no efluente em estudo. Análise realizada por citometria de fluxo utilizando o corante vermelho do Nilo. Dados coletados no filtro FL2-H (585/40 nm) referentes a 100 mil eventos. Fluorescência fornecida em unidades arbitrárias (u.a.). Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % através do teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

4.10 Influência da relação carbono/nitrogênio na produção de poli(3-hidroxibutirato)

A relação carbono/nitrogênio (C/N) presente no meio de cultivo é relatada por diversos autores como um fator determinante na produção de P(3HB) em diversos micro-organismos (RAI; ROY, 2011; LAYCOCK *et al.*, 2014; KALAIYEZHINI; RAMACHANDRAN, 2015). De acordo com os dados apresentados e discutidos no item 4.4, a relação C/N para o efluente é de 50/1, demonstrando grande potencial para a produção do biopolímero. Conforme os resultados obtidos, foi observado que ambos, P(3HB) e biomassa, foram superiores nos cultivos contendo relação C/N de 10/1 (Figuras 45 A e B). Neste experimento, a concentração de carbono foi mantida constante, enquanto a de nitrogênio foi variada com a adição de NH_4Cl . Desta forma, a maior produção de biomassa e de P(3HB) na relação C/N de 10/1 pode estar associada a maior concentração de nitrogênio disponível no meio e, consequentemente, ao aumento da concentração de proteínas auxiliando o metabolismo.

De uma forma geral nos organismos, o requerimento da fonte de carbono é consideravelmente superior ao requerimento de nitrogênio, e um equilíbrio nestes elementos é fundamental para o desenvolvimento correto e determina como a matéria orgânica será

utilizada. Chanprateep e colaboradores (2008) identificaram que em condições ricas em nitrogênio ocorreu a produção de P(3HB-co-4HB) com alta fração molar de 4HB pela bactéria *Ralstonia eutropha* A-04. Os autores sugerem que estes resultados estão associados ao aumento da fonte de nitrogênio, que permite uma maior disponibilidade de monômeros de 4-hidroxibutirato (4HB). Isto se dá devido ao aumento da concentração de acetil-CoA e consequente inibição da reação de cetólise que transforma uma molécula de 4-hidroxibutiril-CoA em duas moléculas de acetil-CoA.

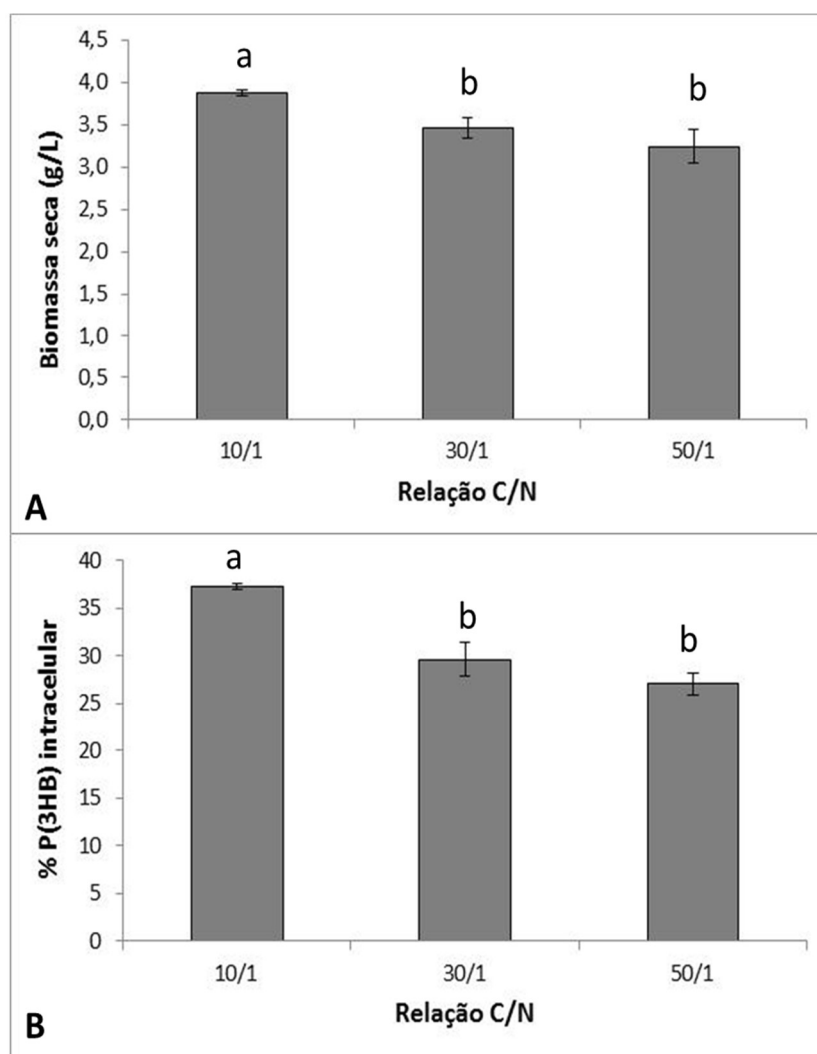


Figura 45. Biomassa seca (A) e P(3HB) intracelular (B) obtidos nas diferentes relações C/N. Avaliação realizada em triplicata para cada tratamento utilizando o efluente como fonte de nutrientes. Variação da relação C/N obtida com a adição de NH_4Cl . Análise realizada em triplicata experimental para cada tratamento. Valores médios dos tratamentos sinalizados com mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5 % através do teste de Tukey. Barras indicam o desvio padrão em cada tratamento.

A produção de P(3HB) não depende apenas da alta relação C/N, mas também de um

correto balanço entre as substâncias fornecidas como nutrientes. Como exemplo deste balanço, pode-se citar o trabalho realizado por Wei e colaboradores (2011), que avaliaram a produção de P(3HB) por *Cupriavidus taiwanensis* 184 nas relações C/N entre 1/1 e 20/1 e observaram maior produção em relações intermediárias. Neste trabalho, os autores obtiveram acúmulo máximo do biopolímero de 58 % (m/m) na relação C/N de 8/1. Apesar dos diversos estudos em função da limitação de nutrientes para alguns micro-organismos, esta condição não é essencial, sendo capazes de produzir diferentes classes de PHA de forma associada ao crescimento celular (IBRAHIM *et al.*, 2010; DJONLAGIC; NIKOLIC, 2011). Na patente desenvolvida por Eggink e colaboradores (1995), os autores descrevem que a bactéria *Alcaligenes eutrophus* GE1 é capaz de acumular até 80 % da biomassa seca em P(3HB) sem a limitação de nutrientes utilizando glicerol como fonte de carbono. As bactérias *Chelatococcus daeguensis* TAD1 (Xu *et al.*, 2014) e *Zobellella denitrificans* MW1 (IBRAHIM; STEINBÜCHEL, 2009) são outros exemplos de micro-organismos com capacidade de acumular P(3HB) associado ao crescimento. Com base nestes dados, sugerem-se maiores estudos de forma a verificar se o micro-organismo de estudo enquadra-se como um produtor de P(3HB) associado ao crescimento.

4.11 Otimização da produção de poli(3-hidroxibutirato) utilizando o efluente como única fonte de nutrientes

4.11.1 Seleção das variáveis do processo que afetam a produção de poli(3-hidroxibutirato)

Para avaliar o efeito das cinco variáveis escolhidas (temperatura, pH inicial, agitação, inóculo e tempo) na produção de P(3HB) (variável resposta em g/L), foi aplicado um planejamento experimental Plackett-Burman (PB). Para tanto, os cultivos foram realizados em frascos do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de efluente concentrado e esterilizado. Após esterilização do efluente, o pH inicial foi ajustado com NaOH para os valores necessários.

A matriz de experimentos e os resultados correspondentes aos 15 ensaios utilizando o delineamento PB estão apresentados na Tabela 10. As variáveis estudadas resultaram em produção de P(3HB) entre 0 e 1,86 g/L. Os pontos centrais apresentaram pequena variação, indicando boa reprodutibilidade do processo. A melhor resposta foi obtida no ensaio 6 com produção de 1,86 g/L.

Tabela 10. Matriz de experimentos e respostas observadas para a produção de P(3HB) utilizando o planejamento experimental Plackett-Burman

Ensaio	Temperatura	pH	Agitação	Inóculo	Tempo	P(3HB) (g/L)
1	37	6	250	4	24	0,00
2	37	9	100	10	24	0,32
3	25	9	250	4	72	0,72
4	37	6	250	10	24	0,00
5	37	9	100	10	72	0,54
6	37	9	250	4	72	1,86
7	25	9	250	10	24	0,17
8	25	6	250	10	72	0,00
9	25	6	100	10	72	0,00
10	37	6	100	4	72	0,05
11	25	9	100	4	24	0,19
12	25	6	100	4	24	0,05
13	31	7,5	175	7	48	1,27
14	31	7,5	175	7	48	1,26
15	31	7,5	175	7	48	1,20

A partir dos resultados obtidos, observou-se que as variáveis independentes tempo e pH influenciam na produção de P(3HB) com significância ao nível de 10 % (Figura 46), sendo as únicas variáveis que apresentaram efeito significativo nas condições testadas.

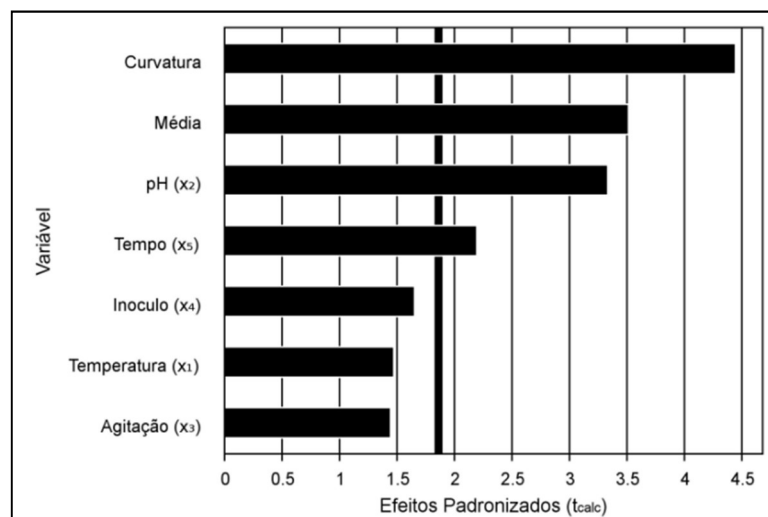


Figura 46. Diagrama de Pareto demonstrando os efeitos observados das variáveis na produção de P(3HB)

Os efeitos em função da produção de P(3HB) estão apresentados na Tabela 11. As variáveis significativas tempo e pH demonstram efeito positivo sobre a variável resposta. Um incremento nos valores de pH e tempo (nível -1 para +1) conduziu a maior produção do

biopolímero. As variáveis temperatura, agitação e inóculo não se mostraram significativas para a produção; no entanto, observa-se que a temperatura e agitação apresentaram efeitos positivos, indicando que seu incremento melhora a produção de P(3HB). Ao contrário, o volume de inóculo afetou negativamente a produção, indicando que menores volumes de inóculo aumentam estes valores.

Tabela 11. Análise de variância (ANOVA) dos efeitos das variáveis independentes sobre a produção de P(3HB)

	Efeito	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	0,3250	0,0924	3,5147	0,0079
Curvatura	1,8366	0,4135	4,4415	0,0021
Temperatura (x₁)	0,2733	0,1849	1,4780	0,1776
pH (x₂)	0,6166	0,1849	3,3345	0,0103
Agitação (x₃)	0,2666	0,1849	1,4419	0,1872
Inoculo (x₄)	-0,3066	0,1849	-1,658	0,1358
Tempo (x₅)	0,4066	0,1849	2,1990	0,0590

4.11.2 Otimização da produção de poli(3-hidroxibutirato) pela metodologia de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Conforme os resultados obtidos no item anterior, os experimentos de DCCR foram realizados utilizando apenas as variáveis tempo e pH inicial. Os resultados para estes ensaios estão apresentados na Tabela 12. Foram observadas variações na concentração de P(3HB) entre 1,49 e 3,16 g/L, sendo o valor máximo obtido no ensaio 4 com produção de 3,16 g/L de P(3HB) na condição de pH 10 e 120 h de cultivo. Este valor foi aproximadamente 295 % superior aos observados nos cultivos anteriores, demonstrando assim um incremento significativo na produção do biopolímero.

Apesar do incremento na concentração de P(3HB), não se pode afirmar que o processo produtivo foi otimizado, uma vez que, conforme os dados apresentados nas Tabelas 13 e 14, as variáveis e suas interações não foram significativas ao nível de 10 % de significância. Outros dados que indicam a não otimização foram o baixo percentual de variação explicada (R^2) de 44,22 % e a relação F_{cal}/F_{tab} igual a 0,22, sendo o necessário para predições valores superiores a 3 (RODRIGUES; IEMMA, 2005). Como justificativas para estes valores, podem ser atribuídos problemas intrínsecos aos experimentos, por exemplo, a variação do pH ao longo do cultivo. Desta forma, outras estratégias devem ser levadas em consideração para o aumento da produção do biopolímero.

Tabela 12. Matriz de experimentos e respostas observadas do delineamento composto central rotacional (DCCR) para a produção de poli(3-hidroxibutirato) com as variáveis tempo e pH inicial

Ensaio	Tempo (X ₁)	pH (X ₂)	P(3HB) (g/L)
1	72,0	8,0	1,60
2	120,0	8,0	1,73
3	72,0	10,0	1,50
4	120,0	10,0	3,16
5	62,1	9,0	2,08
6	129,9	9,0	2,09
7	96,0	7,6	2,44
8	96,0	10,4	1,49
9	96,0	9,0	2,04
10	96,0	9,0	1,69
11	96,0	9,0	1,97

Tabela 13. Valores de regressão das variáveis tempo (X₁) e pH inicial (X₂) e suas interações obtidos pelo delineamento composto central rotacional (DCCR)

Nome	Coefficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	1,9000	0,3009	6,3152	0,0015
X ₁	0,2255	0,1842	1,2240	0,2755
X ₁ ²	0,0856	0,2193	0,3905	0,7123
X ₂	-0,0017	0,1842	-0,0092	0,9930
X ₂ ²	0,0256	0,2193	0,1169	0,9115
X ₁ · X ₂	0,3825	0,2606	1,4680	0,2020

Tabela 14. Análise de variância obtidos no delineamento composto central rotacional (DCCR) utilizando as variáveis independentes tempo (X₁) e pH inicial (X₂)

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}	p-Valor	F _{tab}
Regressão	1,0335	5	0,2067	0,7612	0,6140	3,4500
Resíduos	1,3578	5	0,2716			
Falta de Ajuste	1,2892	3	0,4297	12,5284	0,0748	9,1600
Erro Puro	0,0686	2	0,0343			
Total	2,3913	10				

Narayanan e Ramana (2012) otimizaram a produção de P(3HB) por *Bacillus mycoides* DFC1 utilizando metodologia de DCCR. Neste trabalho, os autores obtiveram produção de aproximadamente 3 g/L em meio sintético composto por glucose e peptona como fontes de

carbono e nitrogênio, respectivamente. A metodologia de DCCR foi utilizada, também, para a otimização da produção de P(3HB) por *Bacillus* sp. CFR 256, utilizando a água de maceração do milho como fonte de nitrogênio com produção de 8,20 g/L do biopolímero (VIJAYENDRA *et al.*, 2007). Hong e colaboradores (2009) obtiveram um incrementaram de 8 % utilizando a metodologia de superfície de resposta na produção de PHA em sistema de lodo ativado. A produção máxima de 3,16 g/L de P(3HB) obtida nesta etapa ainda é inferior aos valores relatados na literatura, porém, deve ser considerado que o micro-organismo foi cultivado utilizando o efluente sem a adição de quaisquer outros nutrientes. Desta forma, a produção do biopolímero na condição proposta possui importante apelo econômico e ambiental no tratamento e valorização de resíduos agroindustriais.

4.12 Caracterização do poli(3-hidroxibutirato)

O biopolímero produzido por *H. hydrothermalis* utilizando o efluente como única fonte de nutrientes, foi isolado e submetido a análises químicas e espectroscópicas para determinar a pureza e estrutura.

Uma das técnicas utilizadas para analisar o biopolímero foi a ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . Os deslocamentos químicos obtidos nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C revelam a presença de grupamentos químicos característicos da molécula de P(3HB) (Figuras 47 e 48). No espectro de RMN de ^1H foi possível observar os deslocamentos químicos em 1,25, 2,55 e 5,25 ppm correspondentes às ressonâncias dos hidrogênios pertencentes aos grupamentos metílico (CH_3), metilênico (CH_2) e metínico (CH), respectivamente. O espectro de RMN de ^1H , com a exceção de sinais de muito baixa intensidade entre 2,0 e 0,5 ppm, apresentam as ressonâncias correspondentes ao P(3HB) como componente maioritário, indicando, desta forma, que este foi isolado com um elevado grau de pureza. Os mesmos grupamentos químicos foram identificados no espectro de RMN de ^{13}C a partir dos deslocamentos químicos em 19,7 (CH_3), 40,7 ppm (CH_2) e 67,6 ppm (CH). O deslocamento químico sinalizado em 169,2 ppm corresponde ao grupamento carbonila ($\text{C}=\text{O}$) da molécula de P(3HB) (ARUN *et al.*, 2009; SHRIVASTAV *et al.*, 2010; PAN *et al.*, 2012).

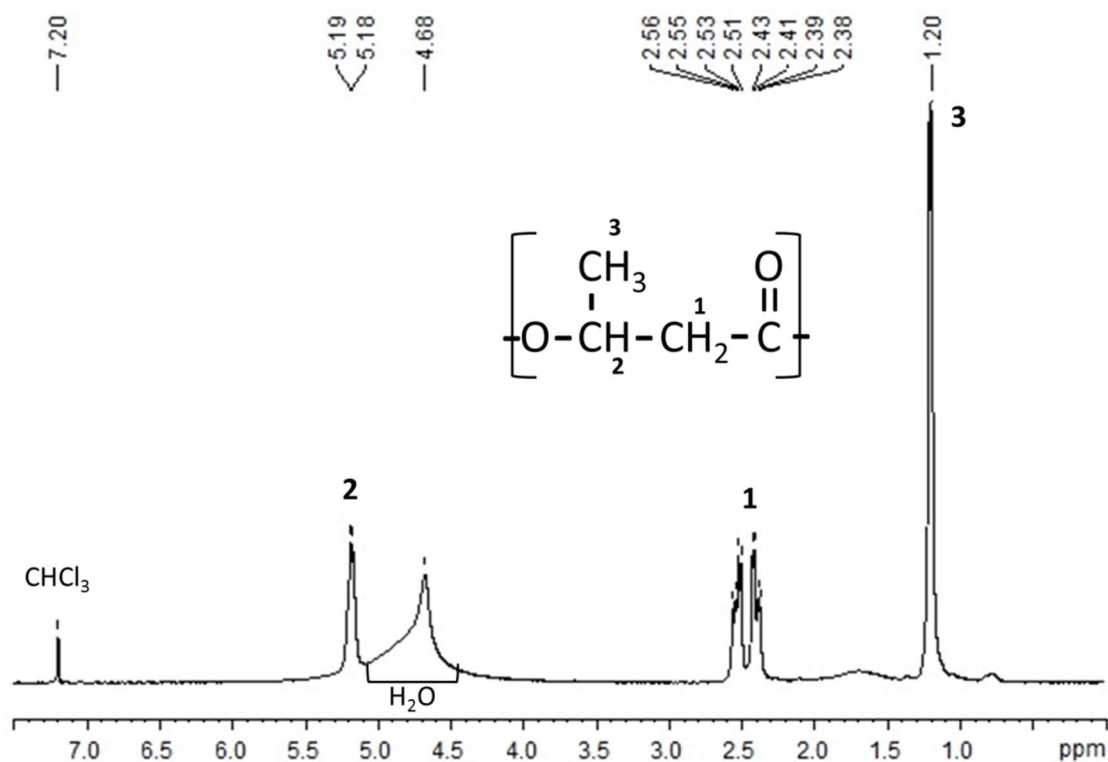


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H do poli(3-hidroxibutirato) produzido por *H. hydrothermalis* utilizando o efluente como única fonte de nutrientes. Espectro obtido a 30 °C utilizando 20 mg do P(3HB) dissolvido em 0,5 mL de clorofórmio deuterado.

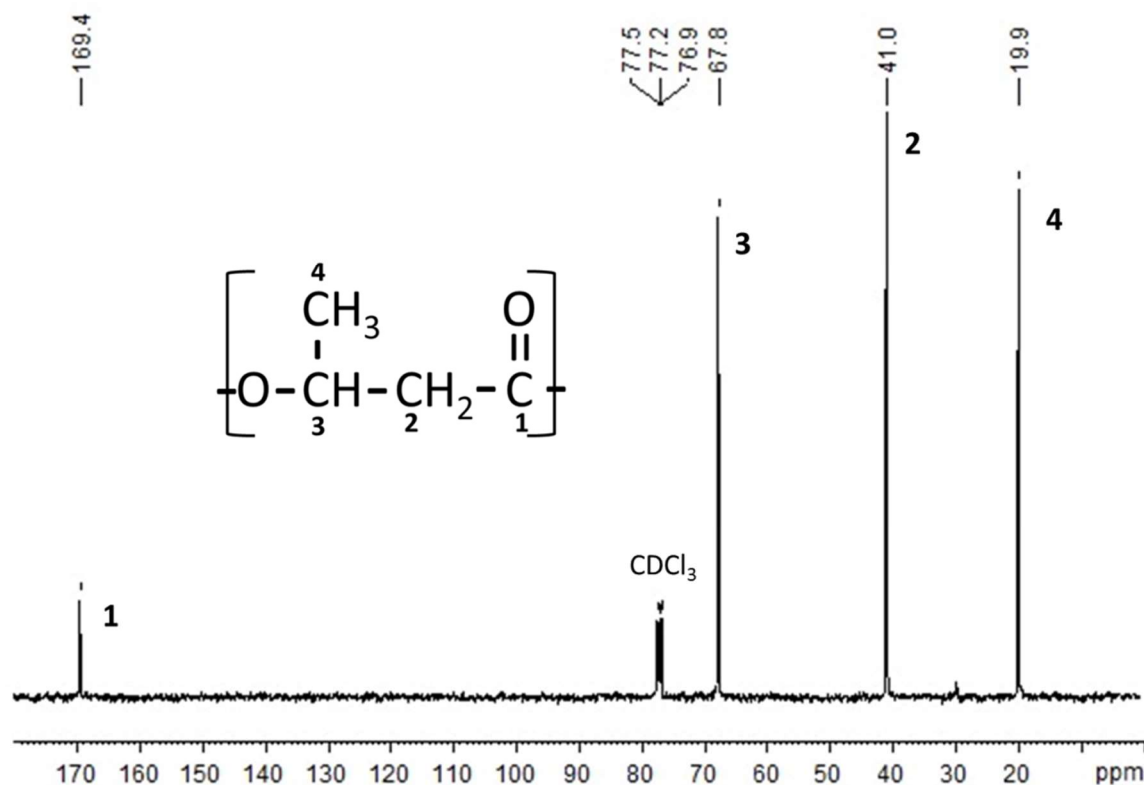


Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C do poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Halomonas hydrothermalis* utilizando o efluente como única fonte de nutrientes. Espectro obtido a 30 °C utilizando 20 mg do poli(3-hidroxibutirato) dissolvido em 0,5 mL de clorofórmio deuterado.

O biopolímero isolado também foi submetido à análise termogravimétrica (TGA). As análises térmicas TGA/DSC revelaram que as características de temperatura de fusão (T_m), transição vítrea (T_g) e temperatura de decomposição (T_{dec}) do P(3HB) produzido são muito similares às relatadas na literatura e ao padrão comercial utilizado (Biocycle) (Tabela 15). A partir da análise de TGA (Figura 49), foi observada menor massa remanescente a 800 °C (indicativo de cinzas) na amostra do P(3HB) extraído ($< 1\%$), quando comparada ao padrão comercial ($\approx 5\%$), indicando alto grau de pureza, assim como já observado pela técnica de RMN de 1H .

Tabela 15. Propriedades de temperatura de fusão (T_m), transição vítrea (T_g) e temperatura de decomposição (T_{dec}) do poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Halomonas hydrothermalis* em comparação ao produto comercial e dados da literatura

	T_m °C	T_g °C	T_{dec} °C
<i>H. hydrothermalis</i>	174,2	2,8	289
Padrão comercial	174,4	1,9	281
Literatura*	170 - 176	1,8 - 2,5	268 - 303

*Valores conforme literaturas citadas abaixo.

Referências: NIKEL *et al.*, (2006); KABE *et al.*, (2012); PAN *et al.*, (2012); CERRONE *et al.*, (2015)

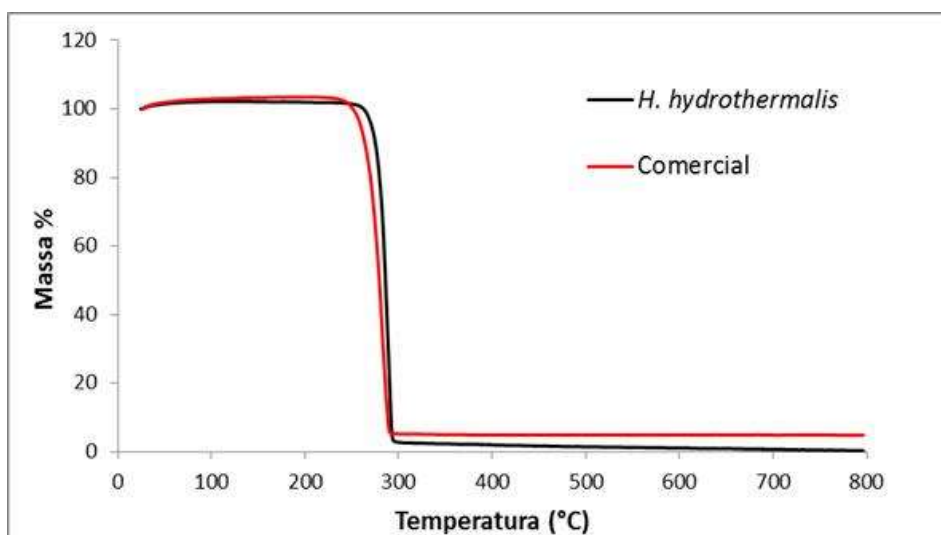


Figura 49. Análise de TGA do P(3HB) produzido por *H. hydrothermalis* utilizando o efluente de hortifrutigranjeiros como única fonte de nutriente e amostra comercial de P(3HB). Análise realizada em cadinhos de Al_2SO_3 com variação de temperatura de 25 a 800 °C em analisador térmico STA 449 F3 Jupiter (Netzsch, Germany).

Finalmente, o biopolímero isolado de *H. hydrothermalis* também foi analisado por espectroscopia de infravermelho acoplada a transformada de Fourier (FTIR). A partir do espectro de FTIR (Figura 50) foi possível identificar bandas características da molécula de

P(3HB) entre 1745 e 1277 cm^{-1} correspondentes às ligações químicas dos grupos C=O e C-O respectivamente. O sinal encontrado em 1450 cm^{-1} esta correlacionado com a vibração da ligação assimétrica entre C-H no grupamento CH_3 (ARUN *et al.*, 2009; KULKARNI *et al.*, 2010; MAYET *et al.*, 2013).

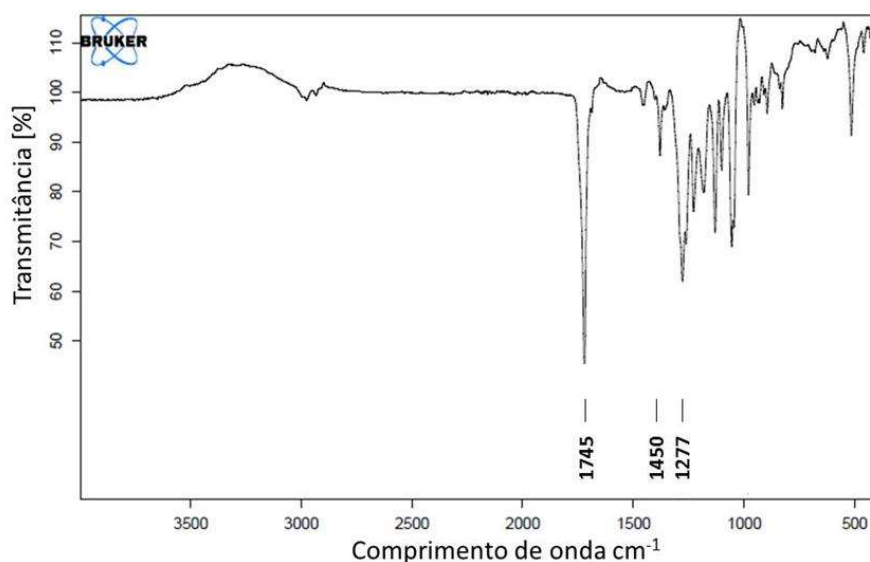


Figura 50. Espectro de FTIR do P(3HB) produzido por *H. hydrothermalis* utilizando o efluente como única fonte de nutrientes. Espectro obtido na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} e analisado através do software OPUS 6.5.

A partir dos resultados químicos e espectroscópicos obtidos, foi confirmada a estrutura do P(3HB) produzido pela bactéria *H. hydrothermalis* quando cultivada no efluente como única fonte de nutrientes. O biopolímero isolado possui características estruturais similares aos relatados na literatura e é comparável ao produto comercial, no entanto, apresenta maior grau de pureza, indicando que o protocolo de extração utilizado foi satisfatório.

4.13 Avaliação da produção de biossurfactante pela bactéria *Halomonas hydrothermalis*

Com o objetivo de aumentar a viabilidade do bioprocesso utilizando o efluente de hortifrutigranjeiros como única fonte de nutrientes, foi pesquisada a presença de biossurfactantes com potencial biotecnológico no caldo da fermentação. Após o cultivo de *H. hydrothermalis* a biomassa bacteriana foi isolada e o caldo da fermentação foi acidificado até pH 2,0. O material precipitado foi resolubilizado em água, dialisado e liofilizado, originando a fração BH1 (item 3.18).

Através das análises de colapso de gota e emulsificação em querosene da fração BH1,

foi observado que *H. hydrothermalis* possui a capacidade de produzir biossurfactante na condição testada (Figura 51). Na Figura 51-A3 é possível observar que de forma semelhante ao controle positivo SDS (Figura 51-A2), a gota contendo a fração BH1 possui espalhamento na superfície de Parafilm® e aumento do ângulo formado entre a superfície do líquido com a superfície de apoio. É possível observar, também, que a fração BH1 possui efeito de emulsificação superior ao SDS 1 % (m/v) (Figura 51-B2/B3). É importante destacar que os mesmos procedimentos utilizados para a obtenção da fração BH1 também foram realizados com o efluente nativo esterilizado (não utilizado em cultivo celular). No entanto, não foi identificada a precipitação de biomoléculas, indicando que o biossurfactante contido na fração BH1 é sintetizado e secretado no meio de cultura pelo micro-organismo *H. hydrothermalis*.

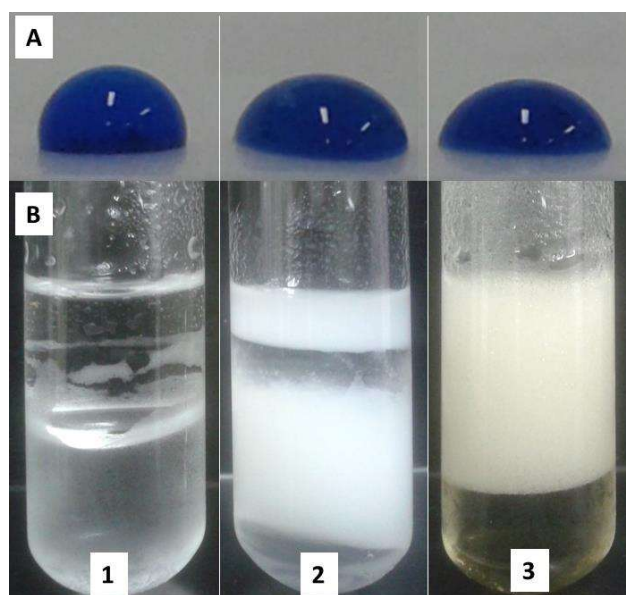


Figura 51. Avaliação da produção de biossurfactante pela bactéria *H. hydrothermalis*. (A) Ensaio do colapso de gota e (B) emulsificação do querosene (B). (1) Controle negativo, água destilada; (2) Controle positivo, SDS 1 % (m/v); (3) Fração BH1 na concentração de 1 mg/mL, biossurfactante extraído do cultivo de *H. hydrothermalis* utilizando o efluente como única fonte de nutrientes.

Diferentes autores descreveram os micro-organismos pertencentes ao gênero *Halomonas* como produtores de biossurfactantes, sendo estas moléculas pertencentes a diferentes grupos químicos (CARVALHO, DE; FERNANDES, 2010; SATPUTE; BANAT; *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2016). Gutiérrez e colaboradores (2007) descreveram as novas linhagens *Halomonas* sp. TG39 e TG67 produtoras de bioemulsificantes com alta ação emulsificante e estáveis em pH ácido e alta temperatura. A bactéria *Halomonas* sp. ANT-3b isolada a partir da interface gelo/água marinha (Estação Baía Terra Nova, Mar de Ross, Antártica) apresentou a capacidade de produzir biossurfactante da classe dos glicolipídios

caracterizado por Pepi e colaboradores (2005). Bioemulsificante de alto peso molecular como o heteropolissacarídeo sulfatado de *Halomonas eurihalina* também foi descrito na literatura (CALVO *et al.*, 1998). Porém, a produção de biossurfactante e/ou bioemulsificante pela espécie em estudo ainda não é descrita na literatura, o que justificou maiores estudos para a caracterização físico-química da(s) molécula(s) com propriedade biossurfactante.

4.14 Caracterização da fração BH1 obtida a partir do cultivo de *Halomonas hydrothermalis*

A partir das análises de fenol-sulfúrico e reação com ninhidrina, foi verificada que a amostra possui maior carga proteica em relação aos carboidratos (Figura 52), indicando que o biossurfactante pode pertencer à classe das glicoproteínas. Apesar da diferença na coloração entre os tubos do controle negativo e fenol-sulfúrico, foi observado que a coloração pós-reação apresenta-se muito próxima à original da amostra.

Nos trabalhos desenvolvidos por Dhasayan e colaboradores (2014) e Donio e colaboradores (2013) foi identificada a produção de biossurfactante da classe dos glicolipídios por micro-organismos do gênero *Halomonas*. Por sua vez, Gutiérrez e colaboradores (2007) caracterizaram os biossurfactantes produzidos pelas bactérias do gênero *Halomonas* como pertencentes à classe das glicoproteínas.

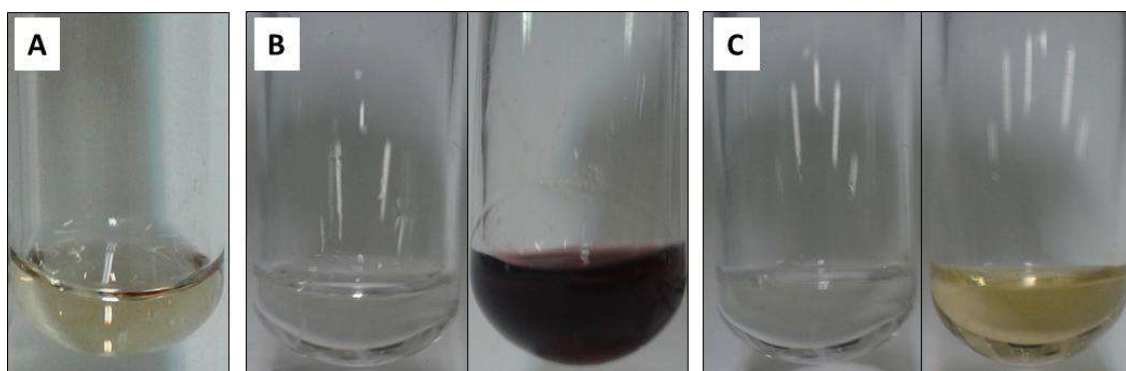


Figura 52. Análise de proteínas e carboidratos totais da fração BH1. A) Fração BH1 solubilizada em água destilada a 0,5 mg/mL, B) Reação de ninhidrina e C) Reação de Fenol-Sulfúrico. Branco (água ultrapura) à esquerda e reação com a amostra à direita.

A fração BH1 foi analisada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) como forma de verificação prévia da composição da amostra (Figura 53). O espectro de FTIR apresentou sinais correspondentes a peptídeos em 3287 cm^{-1} referente a ligações do tipo NH, em 1637 cm^{-1} correspondente a ligações do tipo CO-N e em 1542 cm^{-1} ,

referente ao modo de deformação da ligação NH, quando combinada com o sinal para ligações do tipo C-N. Os sinais em $2961\text{-}2931\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídos à presença de cadeias alifáticas, enquanto o sinal em 1724 cm^{-1} indica grupamentos carbonila. Pereira e colaboradores (2013) descrevem resultados similares ao estudar um biossurfactante da classe dos lipopeptídeos produzido por *Bacillus subtilis*.

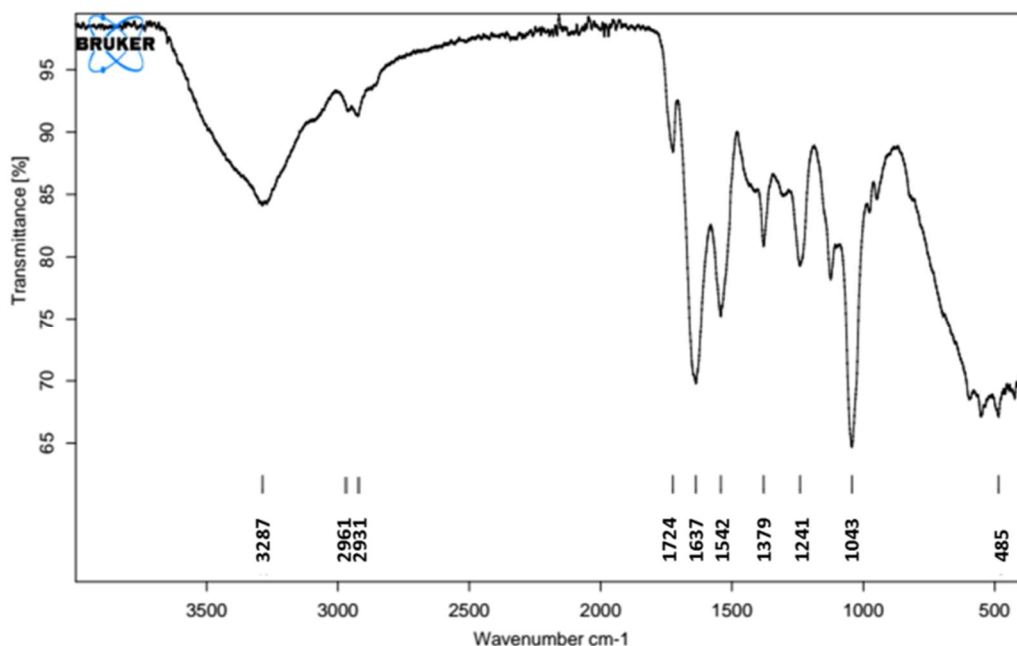


Figura 53. Espectro de infravermelho da fração BH1.

A homogeneidade da fração BH1 foi avaliada por cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) acoplada a detectores de índice de refração (IR), espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) e ultravioleta a 280 nm (UV). A partir da análise do perfil de eluição da fração BH1 (Figura 54), pode-se identificar que esta possui uma constituição heterogênea, sendo possível observar através do índice de refração (IR) a presença de três picos definidos, centrados em 22, 26 e 33 mL. O pico em 22 mL foi detectado pelo MALLS, indicando a presença de uma molécula de elevada massa molar. Esse pico praticamente não absorve em UV, indicando que poderia ser constituído por material polissacarídico. No entanto, os picos de menor massa molar, em 26 e 33 mL, apresenta elevada absorção em UV (280 nm) o que poderia indicar a presença de peptídeos. Sendo assim, percebem-se a necessidade de etapas de purificação e/ou fracionamento ou outras estratégias de extração que forneçam uma fração mais pura.

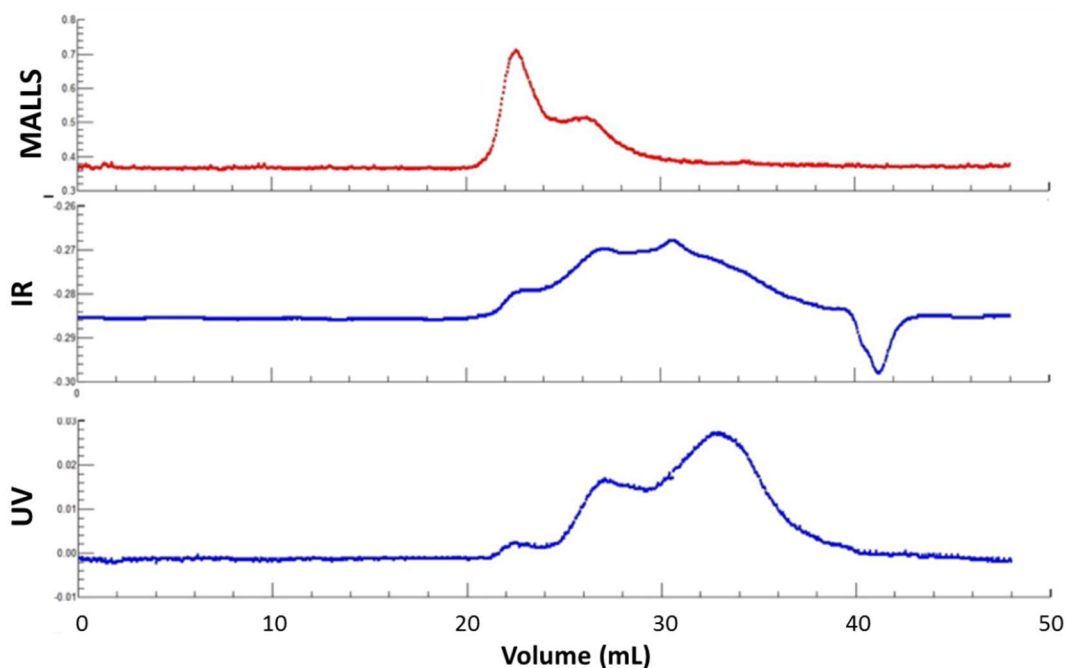


Figura 54. Perfil de eluição da cromatografia de exclusão molecular da fração BH1. Amostra preparada na concentração de 1 mg/mL dissolvida em solução de nitrito de sódio 0,1 M e azida de sódio 200 mg/L em água ultrapura. Detectores: MALLS - de espalhamento de luz com laser no ângulo de 90°; IR - de índice de refração; UV - de ultravioleta a 280 nm.

Com base na determinação de sulfatos foi observado que a fração BH1 possui aproximadamente 6 % de sulfato em sua composição. A produção de moléculas sulfatadas por organismos marinhos é descrita na literatura por diversos autores, sendo os polissacarídeos uma das principais classes de moléculas sulfatadas estudadas por possuírem grande potencial biotecnológico (SATPUTE *et al.*, 2010; SILVA, DA *et al.*, 2016; MATSUI *et al.*, 2003; ROPELLATO *et al.*, 2015). Calvo e colaboradores (1998) avaliaram os efeitos reológicos do heteropolissacarídeo produzido por *Halomonas eurihalina* e determinaram que a redução da concentração de sulfato de 14 para 6,9 % influencia na viscosidade de soluções contendo o polissacarídeo. Gutierrez e colaboradores (2009) identificaram concentrações de sulfato variando de 28,4 a 35,8 % no exopolissacarídeo produzido pela bactéria *Halomonas* sp. TG39 quando cultivada em diferentes fontes de carbono.

4.15 Purificação da fração BH1 e métodos alternativos para a extração do biossurfactante

As frações obtidas nas etapas de extração do biossurfactante e purificação da fração BH1 estão mostradas abaixo na Figura 55. Entre os tratamentos de extração por acidificação,

foi observado maior massa de compostos precipitados para o tratamento BH1 em pH 2,0. Porém, quando a fração BH1 é comparada com as frações obtidas pela precipitação com sulfato de amônio, observa-se massa inferior à fração BH8 e muito próxima a BH9. Para as frações oriundas da amostra BH1, os percentuais de rendimento foram diferentes de acordo com a metodologia adotada, não sendo possível fazer correlações entre estas frações. As frações BH2, BH3, BH5 e BH17 foram descartadas devido à insolubilidade do material após as etapas de extração e purificação. A insolubilidade destas frações pode estar associada a reações de desnaturação de estruturas proteicas, causada pelos reagentes utilizados ou pelo aumento da temperatura no caso da fração BH17.

Com relação à ação emulsificante em querosene, foi observado que as amostras apresentaram ações similares, com exceção das frações BH12 e BH13 (Figura 56). A redução da emulsificação das frações BH12 e BH13 pode indicar a redução da concentração do biossurfactante durante a etapa de purificação. A redução da concentração do biossurfactante na fração BH12 pode estar associada à complexação de parte da molécula alvo com outras substâncias de tamanho superior a 1000 kDa, ocorrendo desta forma a retenção do biossurfactante na membrana. Esta complexação pode explicar o fato das duas frações, tanto BH11 (retido) quanto BH12 (eluído), apresentarem emulsificação em intensidades diferentes.

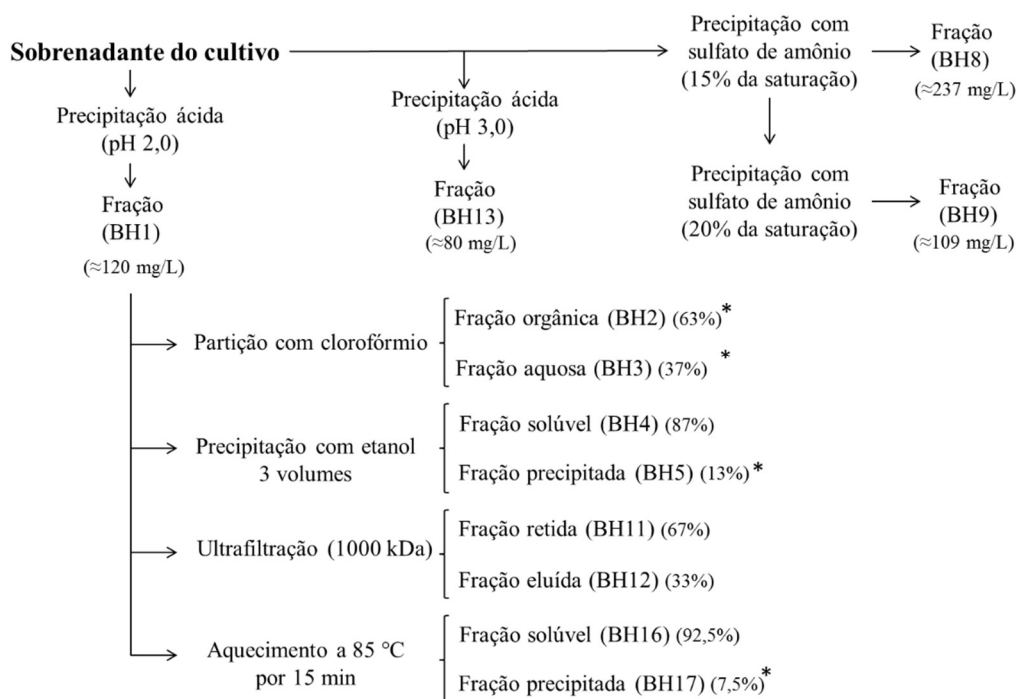


Figura 55. Fluxograma de purificação/fracionamento realizado no sobrenadante do cultivo de *H. hydrothermalis*. Rendimentos demonstrados entre parênteses expressos em percentual em relação à massa de amostra utilizada ou mg de amostra obtida por litro de sobrenadante de cultivo utilizado. Amostras indicadas por asterisco se tornaram insolúveis após tratamento de purificação.

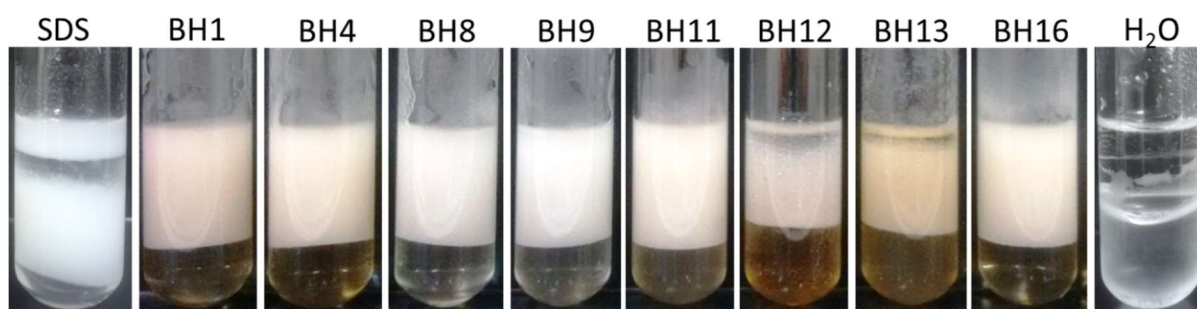


Figura 56. Ação emulsificante em querosene das frações obtidas após as etapas de purificação. Amostras solubilizadas (1 mg/mL) em água ultrapura com pH ajustado para 8,0. Emulsificação realizada em tubos de ensaio de 10 mL contendo 2 mL de querosene e 2 mL de amostra. Agitação em vórtex a 2000 rpm por 1 min. Controle positivo SDS (1 % m/v), controle negativo água ultrapura.

As amostras que apresentaram ação emulsificante em querosene (BH1, BH4, BH8, BH9, BH11 e BH16) foram analisadas quanto à homogeneidade através de cromatografia de exclusão molecular conforme descrito no item 3.19 (Figuras 57 e 58). Os perfis de homogeneidade destas frações demonstram a presença de três grupos distintos de substâncias em aproximadamente 22, 25 e 34 mL, sendo que os dois de maior massa molar (22 e 25 mL) não absorvem em UV.

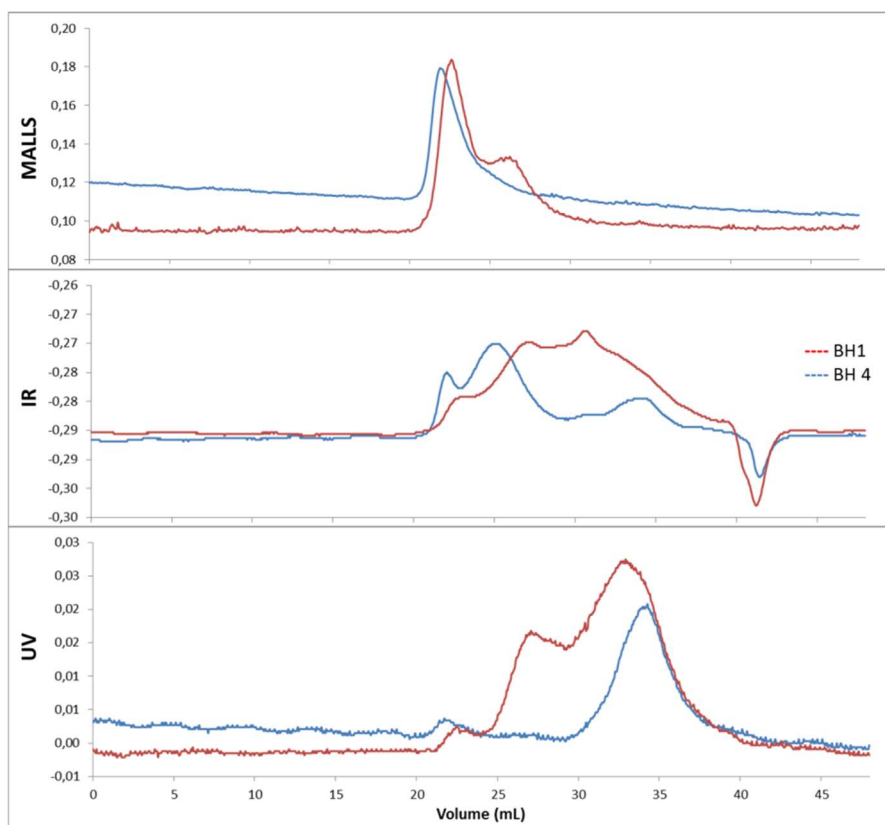


Figura 57. Perfil de eluição das frações BH1 e BH4 por cromatografia de exclusão molecular com detecção por MALLS, IR e UV. Amostras preparadas na concentração de 1 mg/mL dissolvidas em solução de nitrito de sódio 0,1 M e azida de sódio 200 mg/L em água ultrapura.

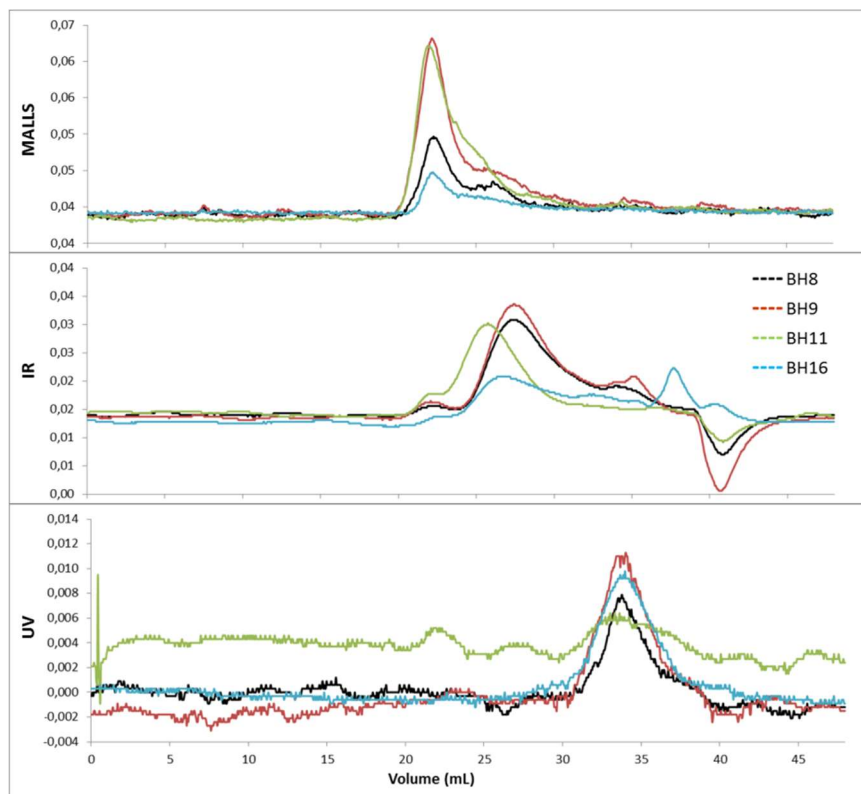


Figura 58. Perfil de eluição das frações BH8, BH9, BH11 e BH16 por cromatografia de exclusão molecular com detecção por MALLS, IR e UV. Amostras preparadas na concentração de 1 mg/mL dissolvidas em solução de nitrito de sódio 0,1 M e azida de sódio 200 mg/L em água ultrapura.

A partir dos perfis de eluição, foi observado que as frações ainda possuem perfil heterogêneo necessitando de novas etapas de fracionamento para a obtenção de amostras puras que permitam a determinação da estrutura da(s) molécula(s) com propriedades emulsificantes. Contudo, as frações provenientes da extração com sulfato de amônio BH8 e BH9, além de se apresentarem com coloração mais límpida, possuem perfil de eluição mais homogêneo em relação à fração BH1. O uso do sulfato de amônio para precipitação e extração de biossurfactantes é descrito na literatura como uma metodologia de baixo custo, com bom rendimento e com facilidade de operação, porém seu uso é dependente das características químicas da molécula alvo (DESAI; BANAT, 1997; SATPUTE; BANPURKAR; *et al.*, 2010; MAKKAR *et al.*, 2011).

5. CONCLUSÕES

- O efluente proveniente de hortifrutigranjeiro do CEASA (unidade Curitiba/PR) apresenta em sua composição frutose e glucose como componentes majoritários;
- A bactéria *Halomonas hydrothermalis* isolada de ambiente marinho possui a capacidade de crescer no efluente de hortifrutigranjeiros como única fonte de nutrientes e acumular o polímero da classe dos polihidroxialcanoatos;
- O biopolímero produzido pelo micro-organismo em estudo na presença do efluente foi caracterizado pelas técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C , FTIR e DSC/TG como sendo polihidroxibutirato (P(3HB));
- Os métodos que se mostraram eficientes para descontaminação microbiológica do efluente foram a esterilização e calagem com aquecimento em vapor fluente. Devido ao menor número de etapas e segurança no processo de descontaminação, a esterilização foi escolhida como metodologia aplicada neste trabalho;
- O planejamento experimental Plackett Burman permitiu determinar que as variáveis temperatura, agitação e taxa de inóculo não possuíram efeito significativo, enquanto pH e tempo de incubação apresentaram efeito positivo na produção de P(3HB);
- Apesar de não ser possível completar a otimização do processo de produção do biopolímero, as condições de pH 10 e 120 horas de cultivo permitiram aumentar o rendimento de P(3HB) em 295 % utilizando o efluente como única fonte de nutrientes;
- A bactéria *H. hydrothermalis* possui a capacidade de produzir as enzimas hidrolíticas amilase, celulase, lipase, pectinase e protease quando submetida ao crescimento com os respectivos substratos como única fonte de carbono;
- A bactéria *H. hydrothermalis* apresenta a capacidade de produzir moléculas com ação emulsificante em querosene e redução da tensão superficial de líquidos. As técnicas de fracionamento utilizadas permitiram isolar frações com moléculas de diferentes características

físico-químicas;

- Os carboidratos glucose e frutose podem ser metabolizados pela bactéria *Halomonas hydrothermalis* e utilizados para o crescimento celular como única fonte de carbono, porém, a bactéria não os utiliza diretamente para a síntese do biopolímero mesmo quando presentes em altas relações C/N;
- A produção do biopolímero por *H. hydrothermalis* utilizando o efluente como fonte de nutrientes é estimulada em baixa relação C/N, demonstrando efeito diferente de grande parte dos resultados relatados na literatura;
- O tratamento do efluente levou à produção de derivados ácidos, como os ácidos acético e fórmico, responsáveis pela redução do pH após esterilização. O ácido acético pode ser metabolizado pelo micro-organismo para a produção de P(3HB).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bactéria *H. hydrothermalis* possui potencial biotecnológico devido a capacidade de produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) além de uma ampla gama de enzimas hidrolíticas e de moléculas com capacidade de redução da tensão superficial e emulsificante.

Através do processo definido o efluente de hortifrutigranjeiro possui potencial para ser utilizado como fonte de nutrientes em processos fermentativos, reduzindo os custos de produção e destinando de forma adequada um efluente potencialmente poluente ao meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTHURI, A.; MATHEW, J.; SINDHU, R.; *et al.* Microbial synthesis of poly-3-hydroxybutyrate and its application as targeted drug delivery vehicle. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 290–296, 2013.
- ALVES, L. P. S.; ALMEIDA, A. T.; CRUZ, L. M.; *et al.* A simple and efficient method for poly-3-hydroxybutyrate quantification in diazotrophic bacteria within 5 minutes using flow cytometry. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 1–10,
- AMARASEKARA, A. S.; WILLIAMS, L. D.; EBEDE, C. C. Mechanism of the dehydration of D-fructose to 5-hydroxymethylfurfural in dimethyl sulfoxide at 150 °C: an NMR study. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 3021–3024, 2008.
- ANBUKARASU, P.; SAUVAGEAU, D.; ELIAS, A. Tuning the properties of polyhydroxybutyrate films using acetic acid via solvent casting. **Scientific reports**, v. 5, n. 17884, p. 1–14, 2015.
- ARENA, E.; CAMPISI, S.; FALLICO, B.; MACCARONE, E.; AGRARIE, I. Fatty Acids of Italian Blood Orange Juices. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 10, p. 4138–4143, 1998.
- ARREBOLA, E.; JACOBS, R.; KORSTEN, L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 386–395, 2010.
- ARUN, A.; ARTHI, R.; SHANMUGABALAJI, V.; EYINI, M. Microbial production of poly- β -hydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 7, p. 2320–2323, 2009.
- BABEL, W.; ACKERMANN, J. U.; BREUER, U. Physiology, regulation, and limits of the synthesis of poly(3HB). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 71, p. 125–57, 2001.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.
- BANAT, I. M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; *et al.* Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427–444, 2010.
- BANAT, I. M.; SATPUTE, S. K.; CAMEOTRA, S. S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. December, p. 1–18, 2014.
- BASSON, C. E.; GROENEWALD, J.-H.; KOSSMANN, J.; CRONJÉ, C.; BAUER, R. Sugar and acid-related quality attributes and enzyme activities in strawberry fruits: Invertase is the main sucrose hydrolysing enzyme. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 1156–1162, 2010.
- BEEBY, M.; CHO, M.; STUBBE, J.; JENSEN, G. J. Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 5, p. 1092–1099, 2012.
- BERA, A.; DUBEY, S.; BHAYANI, K.; *et al.* Microbial synthesis of polyhydroxyalkanoate using seaweed-derived crude levulinic acid as co-nutrient. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 487–94, 2015.
- BEUKER, J.; STEIER, A.; WITTGENS, A.; *et al.* Integrated foam fractionation for

heterologous rhamnolipid production with recombinant *Pseudomonas putida* in a bioreactor. **AMB Express**, v. 6, n. 11, p. 1–10, 2016.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959.

BRASIL. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed. rev ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011.

BRASIL. Agricultura: Resíduos orgânicos da Ceasa de Curitiba viram ração animal. Disponível em: <<http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=66769&tit=Residuos-organicos-da-Ceasa-de-Curitiba-viram-racao-animal>>. Acesso em: 2/3/2017.

BRASIL. Quadros Estatísticos. Quadro Demonstrativo Comercialização e Resíduos CEASA. Disponível em: <<http://www.ceasa.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=384>>. Acesso em: 2/3/2017.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 29–37, 1978.

BRASIL. Manual de métodos de análises de bebidas e vinagres. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Agropecuária, Secretaria de Defesa Laboratorial, Coordenação Geral de Apoio**, 2013.

BUDDE, C. F.; RIEDEL, S. L.; HÜBNER, F.; *et al.* Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1611–1619, 2011.

CAGRI-MEHMETOGLU, A.; KUSAKLI, S.; VENTER, M. VAN DE. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3643–3649, 2012.

CAI, L.; TAN, D.; AIBAI DULA, G.; *et al.* Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 88, p. 1–15, 2011.

CALVÃO, P. S.; CHENAL, J.-M.; GAUTHIER, C.; *et al.* Influence of the rubbery phase on the crystallinity and thermomechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate)/elastomer blends. **Polymer International**, v. 59, n. 6, p. 851–858, 2010.

CALVO, C.; MARTINEZ-CHECA, F.; MOTA, A.; BEJAR, V.; QUESADA, E. Effect of cations, pH and sulfate content on the viscosity and emulsifying activity of the *Halomonas eurihalina* exopolysaccharide. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 205–209, 1998.

CAMILIOS-NETO, D.; BUGAY, C.; SANTANA-FILHO, A. P. DE; *et al.* Production of rhamnolipids in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1395–1403, 2011.

CANILHA, L.; KUMAR CHANDEL, A.; SANTOS MILESSI, T. S. DOS; *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, n. 989572, p. 15 pages, 2012.

- CARDINALI-REZENDE, J.; NAHAT, R. A. T. P. DE S.; GUZMÁN MORENO, C. W.; *et al.* Draft genome sequence of *Halomonas* sp. HG01, a polyhydroxyalkanoate-accumulating strain isolated from Peru. **Genome Announcements**, v. 4, n. 1, p. 1-2, 2016.
- CARVALHO, C. C. C. R. DE; FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 705–27, 2010.
- CARVALHO, C. C. C. R. DE; FERNANDES, P. Siderophores as "Trojan Horses" tackling multidrug resistance? **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 290, p. 1–3, 2014.
- CASANOVA, M.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; MARTINEZ, J. P.; SENTANDREU, R. Characterization of cell wall proteins from yeast and mycelial cells of *Candida albicans* by labelling with biotin: comparison with other techniques. **Infection and immunity**, v. 60, n. 11, p. 4898–906, 1992.
- CASTILHO, L. R.; MITCHELL, D. A.; FREIRE, D. M. G. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5996–6009, 2009.
- CAVALHEIRO, J. M. B. T.; RAPOSO, R. S.; ALMEIDA, M. C. M. D. DE; *et al.* Effect of cultivation parameters on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 391–397, 2012.
- CERRONE, F.; DAVIS, R.; KENNY, S. T.; *et al.* Use of a mannitol rich ensiled grass press juice (EGPJ) as a sole carbon source for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production through high cell density cultivation. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 45–52, 2015.
- CHANPRATEEP, S.; KATAKURA, Y.; VISETKOOP, S.; *et al.* Characterization of new isolated *Ralstonia eutropha* strain A-04 and kinetic study of biodegradable copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p.1205–1215, 2008.
- CHEN, G.-Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 8, p. 2434–2446, 2009.
- CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6565–6578, 2005.
- CHEUNG, H. N. B.; HUANG, G. H.; YU, H. Microbial-growth inhibition during composting of food waste: effects of organic acids. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 5925–34, 2010.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças : fisiologia e manuseio**. UFLA, 2005.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 13–21, 1999.
- CHRISTOVA, N.; LANG, S.; WRAY, V.; *et al.* Production, Structural Elucidation, and In Vitro Antitumor Activity of Trehalose Lipid Biosurfactant from *Nocardia farcinica* Strain. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 439–47, 2015.
- CIESIELSKI, S.; GÓRNIK, D.; MOŻEJKO, J.; *et al.* The diversity of bacteria isolated from antarctic freshwater reservoirs possessing the ability to produce polyhydroxyalkanoates. **Current Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 594–603, 2014.
- CORONADO, M.-J.; VARGAS, C.; HOFEMEISTER, J.; VENTOSA, A.; NIETO, J. J.

Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, n. 1, p. 67–71, 2000.

CUI, H.; YANG, M.; WANG, L.; XIAN, C. J. Identification of a new marine bacterial strain SD8 and optimization of its culture conditions for producing alkaline protease. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2015.

CUI, Y.-W.; ZHANG, H.-Y.; LU, P.-F.; PENG, Y.-Z. Effects of carbon sources on the enrichment of halophilic polyhydroxyalkanoate-storing mixed microbial culture in an aerobic dynamic feeding process. **Scientific Reports**, v. 6, n. 30766, p. 1–13, 2016.

D'ORAZIO, N.; GAMMONE, M. A.; GEMELLO, E.; *et al.* Marine bioactives: pharmacological properties and potential applications against inflammatory diseases. **Marine Drugs**, v. 10, n. 4, p. 812–33, 2012.

DALMASO, G. Z. L.; FERREIRA, D.; VERMELHO, A. B. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 4, p. 1925–65, 2015.

DANG, H.; ZHU, H.; WANG, J.; LI, T. Extracellular hydrolytic enzyme screening of culturable heterotrophic bacteria from deep-sea sediments of the Southern Okinawa Trough. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 71–79, 2009.

DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 10, p. 135–266, 1973.

DEEPAK, V.; RAM KUMAR PANDIAN, S. BABU; KALISHWARALAL, K.; GURUNATHAN, S. Purification, immobilization, and characterization of nattokinase on PHB nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6644–6646, 2009.

DENG, L.-H.; TANG, Y.; LIU, Y. Detoxification of corncob acid hydrolysate with SAA pretreatment and xylitol production by immobilized *Candida tropicalis*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

DESNOUES, E.; GIBON, Y.; BALDAZZI, V.; *et al.* Profiling sugar metabolism during fruit development in a peach progeny with different fructose-to-glucose ratios. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 336, p. 1–13, 2014.

DEWAN, S. S. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications** - BIO030H. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>>. Acesso em: 29/9/2016.

DHASAYAN, A.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J. Production and characterisation of glycolipid biosurfactant by *Halomonas* sp. MB-30 for potential application in enhanced oil recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 7, p. 2571–84, 2014.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 42, p. 6437–6474, 2013.

DIKEN, E.; OZER, T.; ARIKAN, M.; *et al.* Genomic analysis reveals the biotechnological and industrial potential of levan producing halophilic extremophile, *Halomonas smyrnensis* AAD6T. **SpringerPlus**, v. 4, n. 393, p. 1–11, 2015.

DIVYASHREE, M. S.; SHAMALA, T. R.; RASTOGI, N. K. Isolation of polyhydroxyalkanoate from hydrolyzed cells of *Bacillus flexus* using aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and phosphate. **Biotechnology and Bioprocess**

Engineering, v. 14, p. 482–489, 2009.

DJONLAGIC, J.; NIKOLIC, M. S. Biodegradable Polyesters: Synthesis and Physical Properties. In: A. M. Sanjay K Sharma (Ed.); **A Handbook of Applied Biopolymer Technology: Synthesis, Degradation and Applications**. p.149–196, 2011.

DODGSON, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. **The Biochemical journal**, v. 78, n. 2, p. 312–319, 1961.

DOHERTY, W. O. S. Improved sugar cane juice clarification by understanding calcium oxide-phosphate-sucrose systems. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 1829–1836, 2011.

DONIO, M. B. S.; RONICA, F. A.; VIJI, V. T.; *et al.* *Halomonas* sp. BS4, a biosurfactant producing halophilic bacterium isolated from solar salt works in India and their biomedical importance. **SpringerPlus**, v. 2, n. 149, p. 1–10, 2013.

DOU, G.; HE, W.; LIU, H.; MA, Y. *Halomonas heilongjiangensis* sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from saline and alkaline soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 2, p. 403–413, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EDRADA-EBEL, R.; JASPARS, M. The 9th European conference on marine natural products. **Marine Drugs**, v. 13, n. 12, p. 7150–249, 2015.

EGGINK, G.; EENINK, A. H.; HUIZING, H. PHB-Producing microorganism and process for removing glycerol from a culture medium. 1995. **Netherlands: European Patent Office**.

FAKRUDDIN, M. Biosurfactant: production and application. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 1–5, 2012.

FANG, Y.; ZENG, X.; YAN, P.; JING, Z.; JIN, F. An acidic two-step hydrothermal process to enhance acetic acid production from carbohydrate biomass. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 12, p. 4759–4763, 2012.

FAO. **Global food losses and food waste** – Extent, causes and prevention. 2011.

FERNANDES, A. M.; BALASEGARAM, S.; WILLIS, C.; *et al.* Partial failure of milk pasteurization as a risk for the transmission of *Campylobacter* from cattle to humans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, p. 903–909, 2015.

FITE, A.; DYKHUIZEN, R.; LITTERICK, A.; GOLDEN, M.; LEIFERT, C. Effects of ascorbic acid, glutathione, thiocyanate, and iodide on antimicrobial activity of acidified nitrite. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 655–658, 2004.

FLORES, P.; HELLÍN, P.; FENOLL, J. Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 1049–1054, 2012.

FRACCHIA, L.; CAVALLO, M.; MARTINOTTI, M. G.; BANAT, I. M. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications – present status and future potentials. In: D. GHISTA (Ed.); **Biomedical Science, Engineering and Technology**. p.325–373, 2012.

FRANDEN, M. A.; PILATH, H. M.; MOHAGHEGHI, A.; PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 99, p. 1–15, 2013.

- FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant defense against insect herbivores. **International Journal of molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10242–10297, 2013.
- GAO, X.-Y.; ZHI, X.-Y.; LI, H.-W.; *et al.* Draft genome sequence of *Halomonas lutea* strain YIM 91125(T) (DSM 23508(T)) isolated from the alkaline Lake Ebinur in Northwest China. **Standards in Genomic Sciences**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2015.
- GARCÍA-ALONSO, F. J.; JORGE-VIDAL, V.; ROS, G.; PERIAGO, M. J. Effect of consumption of tomato juice enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids on the lipid profile, antioxidant biomarker status, and cardiovascular disease risk in healthy women. **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 415–24, 2012.
- GEORGE, S.; JAYACHANDRAN, K. Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 2, p. 373–383, 2013.
- GHRIBI, D.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; MNIF, I.; *et al.* Investigation of antimicrobial activity and statistical optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant production in solid-state fermentation. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, p. 1–12, 2012.
- GOPINATH, S. C. B.; ANBU, P.; LAKSHMIPRIYA, T.; *et al.* Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–10, 2013.
- GRAY, C. J.; WEISSENBERN, M. J.; EYERS, C. E.; FLITSCH, S. L. Enzymatic reactions on immobilised substrates. **Chem. Soc. Rev. Chem. Soc. Rev**, v. 42, n. 42, p. 6378–6405, 2013.
- GRUNWALD, S.; MOTTET, A.; GROUSSEAU, E.; *et al.* Kinetic and stoichiometric characterization of organoautotrophic growth of *Ralstonia eutropha* on formic acid in fed-batch and continuous cultures. **Microbial Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 155–63, 2015.
- GUDINA, E. J.; FERNANDES, E. C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Front Microbiol**, v. 6, n. 59, p. 1–7, 2015.
- GUDIÑA, E. J.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L. R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 12, p. 667–675, 2013.
- GUDIÑA, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. **Marine Drugs**, v. 14, n. 38, p. 1–15, 2016.
- GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; HEIDELBERG, T. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates copolymers produced by *Pseudomonas putida* bet001 isolated from palm oil mill effluent. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–8, 2012.
- GUPTA, S.; SHARMA, P.; DEV, K.; SOURIRAJAN, A. Halophilic bacteria of lunsu produce an array of industrially important enzymes with salt tolerant activity. **Biochemistry Research International**, v. 2016, p. 1–10, 2016.
- GURUNG, N.; RAY, S.; BOSE, S.; *et al.* A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–18, 2013.
- GUTIERREZ, T.; MORRIS, G.; GREEN, D. H. Yield and physicochemical properties of EPS from *Halomonas* sp. strain TG39 identifies a role for protein and anionic residues (sulfate and phosphate) in emulsification of n -hexadecane. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103,

n. 1, p. 207–216, 2009.

GUTIÉRREZ, T.; MULLOY, B.; BLACK, K.; GREEN, D. H. Glycoprotein emulsifiers from two marine *Halomonas* species: chemical and physical characterization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1716–27, 2007.

GUZMÁN, D.; BALDERRAMA-SUBIETA, A.; CARDONA-ORTUÑO, C.; *et al.* Evolutionary patterns of carbohydrate transport and metabolism in *Halomonas boliviensis* as derived from its genome sequence: influences on polyester production. **Aquatic Biosystems**, v. 8, n. 9, p. 1–12, 2012.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 12, p. 536–544, 2003.

HAFUKA, A.; SAKAIDA, K.; SATOH, H.; *et al.* Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3551–3553, 2011.

HAMPP, N. **Method for Producing Biomass**. p. 1-4, 2004. United States. Disponível em: <<https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US20040029233.pdf>>. .

HARDING, V. J.; WARNEFORD, F. H. S. The ninhydrin reaction with amines and amides. **J. Biol. Chem.**, v. 25, n. 2, p. 337–350, 1916.

HARRINGTON, R.; KARLSON, A. G. Destruction of various kinds of mycobacteria in milk by pasteurization. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 494–495, 1965.

HEJAZI, P.; VASHEGHANI-FARAHANI, E.; YAMINI, Y. Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(β -hydroxybutyrate) recovery. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 5, p. 1519–1523, 2003.

HOBBS, J. K.; MCMASTER, T. J.; MILES, M. J.; BARHAM, P. J. Cracking in spherulites of poly(hydroxybutyrate). **Polymer**, v. 37, n. 15, p. 3241–3246, 1996.

HOMANN, V. V.; SANDY, M.; TINCÚ, J. A.; *et al.* Loihichelins A-F, a suite of amphiphilic siderophores produced by the marine bacterium *Halomonas* LOB-5. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 5, p. 884–888, 2009.

HONG, C.; HAO, H.; HAIYUN, W. Process optimization for PHA production by activated sludge using response surface methodology. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 4, p. 721–727, 2009.

HU, G.-P.; YUAN, J.; SUN, L.; *et al.* Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 514–25, 2011.

HU, Y.; CHEN, J.; HU, G.; *et al.* Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. **Marine drugs**, v. 13, n. 1, p. 202–21, 2015.

HUANG, X.; DUAN, H.; BARRINGER, S. A. Effects of buffer and temperature on formation of furan, acetic acid and formic acid from carbohydrate model systems. **Food Science and Technology**, v. 44, n. 8, p. 1761–1765, 2011.

IBACACHE-QUIROGA, C.; OJEDA, J.; ESPINOZA-VERGARA, G.; *et al.* The hydrocarbon-degrading marine bacterium *Cobetia* sp. strain MM1IDA2H-1 produces a biosurfactant that interferes with quorum sensing of fish pathogens by signal hijacking. **Microbial Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 394–405, 2013.

IBRAHIM, M. H. A.; WILLEMS, A.; STEINBÜCHEL, A. Isolation and characterization of new poly(3HB)-accumulating star-shaped cell-aggregates-forming thermophilic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 5, p. 1579–1590, 2010.

IBRAHIM, M. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6222–6231, 2009.

JAIN, R. M.; MODY, K.; JOSHI, N.; MISHRA, A.; JHA, B. Production and structural characterization of biosurfactant produced by an alkaliphilic bacterium, *Klebsiella* sp.: Evaluation of different carbon sources. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 108, p. 199–204, 2013.

JANZOWSKI, C.; GLAAB, V.; SAMIMI, E.; SCHLATTER, J.; EISENBRAND, G. 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 801–809, 2000.

JENA, J.; KUMAR, R.; DIXIT, A.; PANDEY, S.; DAS, T. Evaluation of simultaneous nutrient and cod removal with polyhydroxybutyrate (PHB) accumulation using mixed microbial consortia under anoxic condition and their bioinformatics analysis. **PLoS ONE**, v. 10, p. 1–20, 2015.

JENSEN, P.; FENICAL, W. Marine bacterial diversity as a resource for novel microbial products. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 346–351, 1996.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014.

JIANG, H.; DONG, H.; ZHANG, G.; *et al.* Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3832–45, 2006.

JIANG, J.; PAN, Y.; MENG, L.; *et al.* *Halomonas zhaodongensis* Sp. Nov., a slightly halophilic bacterium isolated from saline-alkaline soils in Zhaodong, China. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 104, n. 5, p. 685–694, 2013.

JIANG, W.; LI, C.; XU, B.; *et al.* *Halomonas shantousis* sp. nov., a novel biogenic amines degrading bacterium isolated from Chinese fermented fish sauce. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 6, p. 1073–1080, 2014.

JOHNSON, K.; KLEEREBEZEM, R.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. **Water Research**, v. 44, n. 7, p. 2141–2152, 2010.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N.-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for biofuels**, v. 6, n. 1, p. 16, 2013.

KABE, T.; TSUGE, T.; KASUYA, K.; *et al.* Physical and structural effects of adding ultrahigh-molecular-weight poly[(r)-3-hydroxybutyrate] to wild-type poly[(r)-3-hydroxybutyrate]. **Macromolecules**, v. 45, p. 1858–1865, 2012.

KALAIYEZHINI, D.; RAMACHANDRAN, K. B. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) from glycerol by *Paracoccus denitrificans* in a batch bioreactor: effect of process variables. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 45, n. 1, p. 69–83, 2015.

KANG, H.-K.; SEO, C. H.; PARK, Y. The effects of marine carbohydrates and glycosylated compounds on human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p.

6018–56, 2015.

KANG, H. K.; SEO, C. H.; PARK, Y. Marine peptides and their anti-infective activities. **Marine Drugs**, v. 13, n. 1, p. 618–54, 2015.

KAWATA, Y.; JIN, Y.-X.; NOJIRI, M. Efficient secretion of (R)-3-hydroxybutyric acid from *Halomonas* sp. KM-1 cultured with saccharified Japanese cedar under microaerobic conditions. **Bioresource Technology**, v. 140, p. 443–5, 2013.

KAWATA, Y.; NISHIMURA, T.; MATSUSHITA, I.; TSUBOTA, J. Efficient production and secretion of pyruvate from *Halomonas* sp. KM-1 under aerobic conditions. **AMB Express**, v. 6, n. 22, p. 1–8, 2016.

KAYE, J. Z.; MÁRQUEZ, M. C.; VENTOSA, A.; BAROSS, J. A. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: Halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 499–511, 2004.

KHOSRAVI-DARANI, K.; MOKHTARI, Z. B.; AMAI, T.; TANAKA, K. Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C1 carbon sources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1407–1424, 2013.

KIM, K. K.; JIN, L.; YANG, H. C.; LEE, S. T. *Halomonas gomseomensis* sp. nov., *Halomonas janggokensis* sp. nov., *Halomonas salaria* sp. nov. and *Halomonas denitrificans* sp. nov., moderately halophilic bacteria isolated from saline water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 675–681, 2007.

KIM, W.; RACIMO, F.; SCHLUTER, J.; LEVY, S. B.; FOSTER, K. R. Importance of positioning for microbial evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 16, p. E1639–E1647, 2014.

KIRAN, G. S.; LIPTON, A. N.; KENNEDY, J.; DOBSON, A. D. W.; SELVIN, J. A halotolerant thermostable lipase from the marine bacterium *Oceanobacillus* sp. PUMB02 with an ability to disrupt bacterial biofilms. **Bioengineered Bugs**, 2014.

KIRAN, G. S.; NISHANTH, L. A.; PRIYADHARSHINI, S.; ANITHA, K.; SELVIN, J. Effect of Fe nanoparticle on growth and glycolipid biosurfactant production under solid state culture by marine *Nocardiopsis* sp. MSA13A. **BMC biotechnology**, v. 14, p. 48, 2014.

KOLLER, M.; ATLIĆ, A.; DIAS, M.; REITERER, A.; BRAUNEGG, G. Microbial PHA Production from waste raw materials. In: G.-Q. Chen (Ed.); **Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications**, v. 14, p.86–119, 2010.

KOLLER, M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. **Biomacromolecules**, v. 6, n. year 2002, p. 561–565, 2005.

KOLLER, M.; NIEBELSCHÜTZ, H.; BRAUNEGG, G. Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 6, p. 549–562, 2013.

KOSHRAVI-DARANI, K.; MOZAFARI, M. Supercritical fluid application in food and bioprocess technology. **Mass Transfer - Advanced Aspects**. p.555–578, 2011.

KRIEGER, N.; CAMILIOS NETO, D.; MITCHELL, D. A. Production of microbial biosurfactants by solid-state cultivation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 672, p. 203–10, 2010.

- KÜGLER, J. H.; MUHLE-GOLL, C.; HANSEN, S. H.; *et al.* Glycolipids produced by *Rouxiella* sp. DSM 100043 and isolation of the biosurfactants via foam-fractionation. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 82, 2015.
- KULKARNI, S. O.; KANEKAR, P. P.; NILEGAONKAR, S. S.; SARNAIK, S. S.; JOG, J. P. Production and characterization of a biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9765–9771, 2010.
- KUMAR, S.; CHAKRABARTI, T. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from activated sludge. **A Handbook of Applied Biopolymer Technology: Synthesis, Degradation and Applications**, , n. 12, p. 452–472, 2011.
- KUMAR, S.; KARAN, R.; KAPOOR, S.; S P, S.; S K, K. Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1595–603, 2012.
- KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Express Polymer Letters**, v. 5, n. 7, p. 620–634, 2011.
- LADAU, J.; SHARPTON, T. J.; FINUCANE, M. M.; *et al.* Global marine bacterial diversity peaks at high latitudes in winter. **The ISME journal**, v. 7, n. 9, p. 1669–77, 2013.
- LAW, J. H.; SLEPECKY, R. A. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. **Journal of Bacteriology**, v. 82, n. 1, p. 33–36, 1961.
- LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 2, p. 397–442, 2014.
- LEE, J.; JUNG, S.-G.; PARK, C.-S.; *et al.* Tumor-specific hybrid polyhydroxybutyrate nanoparticle: Surface modification of nanoparticle by enzymatically synthesized functional block copolymer. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 2941–2944, 2011.
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 1, p. 1–14, 1996.
- LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1–8, 2012.
- LI, Y.; CHEN, J.; LUN, S.-Y. Biotechnological production of pyruvic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 4, p. 451–459, 2001.
- LI, Y.; LI, Z.; YAMANAKA, K.; *et al.* Directed natural product biosynthesis gene cluster capture and expression in the model bacterium *Bacillus subtilis*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 9383, p. 1–7, 2015.
- LIAU, C. P.; AHMAD, M. BIN; SHAMELI, K.; *et al.* Preparation and characterization of polyhydroxybutyrate/polycaprolactone nanocomposites. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–9, 2014.
- LIMACHER, A.; KERLER, J.; DAVIDEK, T.; SCHMALZRIED, F.; BLANK, I. Formation of furan and methylfuran by maillard-type reactions in model systems and food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 3639–3647, 2008.
- LITTLECHILD, J. A. Archaeal enzymes and applications in industrial biocatalysts. **Archaea**, v. 2015, p. 1–10, 2015.

- LIU, G.; WU, S.; JIN, W.; SUN, C. Amy63, a novel type of marine bacterial multifunctional enzyme possessing amylase, agarase and carrageenase activities. **Scientific Reports**, v. 6, n. 18726, p. 1–12, 2015.
- LOURDES MORENO, M. DE; PÉREZ, D.; GARCÍA, M. T.; MELLADO, E. Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. **Life**, v. 3, n. 1, p. 38–51, 2013.
- LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 12, p. 715–720, 2003.
- MACRAE, R. M.; WILKINSON, J. F. Poly-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. **Journal of General Microbiology**, v. 19, n. 1958, p. 210–222, 1958.
- MAGAIA, T.; UAMUSSE, A.; SJÖHOLM, I.; SKOG, K. Dietary fiber, organic acids and minerals in selected wild edible fruits of Mozambique. **SpringerPlus**, v. 2, n. 88, p. 1–8, 2013.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, n. 5, p. 1–19, 2011.
- MARANG, L.; JIANG, Y.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN; KLEEREBEZEM, R. Impact of non-storing biomass on PHA production: An enrichment culture on acetate and methanol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 74–80, 2014.
- MARTÍNEZ, V.; GARCÍA, P.; GARCÍA, J. L.; PRIETO, M. A. Controlled autolysis facilitates the polyhydroxyalkanoate recovery in *Pseudomonas putida* KT2440. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 533–547, 2011.
- MATSUI, M. S.; MUIZZUDDIN, N.; ARAD, S.; MARENUS, K. Sulfated Polysaccharides from Red Microalgae Have Antiinflammatory Properties In Vitro and In Vivo. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p. 13–22, 2003.
- MAYET, C.; DENISET-BESSEAU, A.; PRAZERES, R.; ORTEGA, J. M.; DAZZI, A. Analysis of bacterial polyhydroxybutyrate production by multimodal nanoimaging. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 3, p. 369–374, 2013.
- MEDVECKY, L. Microstructure and properties of polyhydroxybutyrate-chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. 537973, p. 1–8, 2012.
- MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; *et al.* Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503–11, 2012.
- MILLER, E. N.; TURNER, P. C.; JARBOE, L. R.; INGRAM, L. O. Genetic changes that increase 5-hydroxymethyl furfural resistance in ethanol-producing *Escherichia coli* LY180. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 5, p. 661–667, 2010.
- MIRANDA, J. S.; SILVA, N. C. A.; BASSI, J. J.; *et al.* Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 392–403, 2014.
- MNIF, S.; CHAMKHA, M.; SAYADI, S. Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions. **Journal**

of **Applied Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 785–794, 2009.

MOHAMAD, N. R.; HAZIQAH, N.; MARZUKI, C.; *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

MORMILE, M. R.; ROMINE, M. F.; GARCIA, M. T.; *et al.* *Halomonas campisalis* sp. nov., a denitrifying, moderately haloalkaliphilic bacterium. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 551–558, 1999.

MOŻEJKO-CIESIELSKA, J.; KIEWISZ, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? **Microbiological Research**, v. 192, p. 271–282, 2016.

MROZ, Z. Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. **Advances in Pork Production**, v. 16, p. 169–180, 2005.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509–515, 2006.

NARAYANAN, A.; RAMANA, K. V. Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycoides* DFC1 using response surface optimization for physico-chemical process parameters. **3 Biotech**, v. 2, p. 287–296, 2012.

NATH, A.; DIXIT, M.; BANDIYA, A.; CHAVDA, S.; DESAI, A. J. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5749–5755, 2008.

NERURKAR, A. S.; HINGURAO, K. S.; SUTHAR, H. G. Bioemulsifiers from marine microorganisms. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 68, n. 4, p. 273–277, 2009.

NIE, S.; HUANG, J.; HU, J.; *et al.* Effect of pH, temperature and heating time on the formation of furan in sugar–glycine model systems. **Food Science and Human Wellness**, v. 2, n. 2, p. 87–92, 2013.

NIKEL, P. I.; ALMEIDA, A. DE; MELILLO, E. C.; GALVAGNO, M. A.; PETTINARI, M. J. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3949–3954, 2006.

NORDBY, H. E.; NAGY, S. Fatty acid profiles of citrus juice and seed lipids. **Phytochemistry**, v. 8, n. 10, p. 2027–2038, 1969.

OJIMA, T.; SABURI, W.; YAMAMOTO, T.; KUDO, T. Characterization of *Halomonas* sp. strain H11 α -glucosidase activated by monovalent cations and its application for efficient synthesis of α -D-glucosylglycerol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 1836–45, 2012.

OKAIYETO, K.; NWODO, U. U.; MABINYA, L. V; OKOH, A. I. Characterization of a bioflocculant produced by a consortium of *Halomonas* sp. Okoh and *Micrococcus* sp. Leo. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 10, p. 5097–110, 2013.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.

ORCUTT, B. N.; SYLVAN, J. B.; KNAB, N. J.; EDWARDS, K. J. Microbial ecology of the dark ocean above, at, and below the seafloor. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 361–422, 2011.

- PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633–54, 2011.
- PAN, W.; PERROTTA, J. A.; STIPANOVIC, A. J.; NOMURA, C. T.; NAKAS, J. P. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 459–469, 2012.
- PARAGES, M. L.; GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A.; REEN, F. J.; DOBSON, A. D. W.; O’GARA, F. Integrated (Meta) genomic and synthetic biology approaches to develop new biocatalysts. **Marine Drugs**, v. 14, n. 62, p. 1–29, 2016.
- PARTE, A. C. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D613–D616, 2014.
- PATHAK, K. V; KEHARIA, H. Application of extracellular lipopeptide biosurfactant produced by endophytic *Bacillus subtilis* K1 isolated from aerial roots of banyan (*Ficus benghalensis*) in microbially enhanced oil recovery (MEOR). **3 Biotech**, v. 4, n. 1, p. 41–48, 2014.
- PEÑA, C.; CASTILLO, T.; GARCÍA, A.; MILLÁN, M.; SEGURA, D. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): A review of recent research work. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 278–293, 2014.
- PENESYAN, A.; KJELLEBERG, S.; EGAN, S. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 438–459, 2010.
- PEPI, M.; CESÀRO, A.; LIUT, G.; BALDI, F. An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, p.157–166, 2005.
- PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; *et al.* Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259–268, 2013.
- PIPER, P.; CALDERON, C. O.; HATZIXANTHIS, K.; MOLLAPOUR, M. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, v. 1056, n. 147, p. 26–2635, 2016.
- PLEISSNER, D.; LAM, W. C.; HAN, W.; *et al.* Fermentative polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from bakery waste. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 819474, p. 1–8, 2014.
- POLI, A.; DONATO, P. DI; ABBAMONDI, G. R.; NICOLAUS, B. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by Archaea. **Archaea**, v. 2011, p. 1–13, 2011a.
- POLI, A.; DONATO, P. DI; ABBAMONDI, G. R.; NICOLAUS, B. Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. **Archaea (Vancouver, B.C.)**, v. 2011, p. 693253, 2011b.
- QI, L.; MUI, Y. F.; LO, S. W.; *et al.* Catalytic conversion of fructose, glucose, and sucrose to 5-(hydroxymethyl)furfural and levulinic and formic acids in γ -valerolactone as a green solvent. **ACS Catalysis**, v. 4, n. 5, p. 1470–1477, 2014.
- QU, L.; LAI, Q.; ZHU, F.; *et al.* *Halomonas daqiaonensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium isolated from a littoral saltern. **International Journal of Systematic**

and **Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 1612–1616, 2011.

QUÉMÉNEUR, M.; HAMELIN, J.; BARAKAT, A.; *et al.* Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 3150–3159, 2012.

QUILLAGUAMÁN, J.; DELGADO, O.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. Poly(β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1–2, p. 148–154, 2006.

QUILLAGUAMÁN, J.; GUZMÁN, H.; VAN-THUOC, D.; HATTI-KAUL, R. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: Current potential and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 1687–1696, 2010.

QUILLAGUAMÁN, J.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B.; ALVAREZ, M. T.; DELGADO, O. *Halomonas boliviensis* sp. nov., an alkalitolerant, moderate halophile isolated from soil around a Bolivian hypersaline lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 721–725, 2004.

QUILLAGUAMÁN, J.; MUÑOZ, M.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. Optimizing conditions for poly(β -hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 981–986, 2007.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 6, p. 1277–1281, 2002.

RAHMAN, H.; AUSTIN, B.; MITCHELL, W. J.; *et al.* Novel anti-infective compounds from marine bacteria. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 498–518, 2010.

RAI, R.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: The emerging new green polymers of choice. **Biodegradable Polymers and Green Chemistry**, p.79–101, 2011.

RAMSAY, J. A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIE, C.; RAMSAY, B. A. Extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnology Techniques**, v. 8, n. 8, p. 589–594, 1994.

RANATUNGA, T. D.; JERVIS, J.; HELM, R. F.; MCMILLAN, J. D.; WOOLEY, R. J. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: The role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3–5, p. 240–247, 2000.

RAUHA, J.-P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; *et al.* Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 3–12, 2000.

REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochem. J**, v. 376, p. 15–33, 2003.

RHIM, J. W.; PARK, H. M.; HA, C. S. Bio-nanocomposites for food packaging applications. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 10–11, p. 1629–1652, 2013.

RICO, C.; MUÑOZ, N.; RICO, J. L. Anaerobic co-digestion of cheese whey and the screened liquid fraction of dairy manure in a single continuously stirred tank reactor process: Limits in co-substrate ratios and organic loading rate. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 327–33, 2015.

RIVERA-TERCEROS, P.; TITO-CLAROS, E.; TORRICO, S.; *et al.* Production of poly(3-

hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis* in an air-lift reactor. **Journal of Biological Research**, v. 22, p. 8, 2015.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 2015.

ROCHA-MARTIN, J.; HARRINGTON, C.; DOBSON, A. D. W.; O’GARA, F. Emerging strategies and integrated systems microbiology technologies for biodiscovery of marine bioactive compounds. **Marine Drugs**, v. 12, n. 6, p. 3516–59, 2014.

RODGERS, M.; WU, G. Production of polyhydroxybutyrate by activated sludge performing enhanced biological phosphorus removal. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 1049–1053, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 2005.

ROHBAN, R.; MOHAMMAD, ·; AMOOZEGAR, A.; VENTOSA, A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 36, p. 333–340, 2009.

ROMANO, I.; LAMA, L.; NICOLAUS, B.; *et al.* *Halomonas alkaliphila* sp. nov., a novel halotolerant alkaliphilic bacterium isolated from a salt pool in Campania (Italy). **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 339–348, 2006.

ROMANO, I.; NICOLAUS, B.; LAMA, L.; *et al.* Accumulation of osmoprotectants and lipid pattern modulation in response to growth conditions by *Halomonas pantelleriense*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 342–352, 2001.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. Minireview. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 229–236, 2001.

ROPELLATO, J.; CARVALHO, M. M.; FERREIRA, L. G.; *et al.* Sulfated heterorhamnans from the green seaweed *Gayralia oxysperma*: partial depolymerization, chemical structure and antitumor activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 476–485, 2015.

SACHDEV, D. P.; CAMEOTRA, S. S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1005–1016, 2013.

SAHA, M.; SARKAR, S.; SARKAR, B.; *et al.* Microbial siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 5, p. 3984–3999, 2016.

SAJNA, K. V.; SUKUMARAN, R. K.; JAYAMURTHY, H.; *et al.* Studies on biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 and their potential application as laundry detergent additives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 85–92, 2013.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 401, p. 1–31, 2016.

SANTOS, R. R. DOS; ARAÚJO, O. DE Q. F.; MEDEIROS, J. L. DE; CHALOUB, R. M. Cultivation of *Spirulina maxima* in medium supplemented with sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 204, p. 38–48, 2016.

SATPUTE, S. K.; BANAT, I. M.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANPURKAR, A. G.; CHOPADE, B. A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 4, p. 436–450, 2010.

SATPUTE, S. K.; BANPURKAR, A. G.; DHAKEPHALKAR, P. K.; BANAT, I. M.; CHOPADE, B. A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 127–144, 2010.

SEGHAL KIRAN, G.; NISHANTH LIPTON, A.; KENNEDY, J.; DOBSON, A. D. W.; SELVIN, J. A halotolerant thermostable lipase from the marine bacterium *Oceanobacillus* sp. PUMB02 with an ability to disrupt bacterial biofilms. **Bioengineered**, v. 5, n. 5, p. 305–18, 2014.

SHRIVASTAV, A.; KIM, H.-Y.; KIM, Y.-R. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. K.; SHETHIA, B.; *et al.* Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 2, p. 283–287, 2010.

SILVA, A. C. R. DA; FERREIRA, L. G.; DUARTE, M. E. R.; *et al.* Protective Effect of the Sulfated Agaran Isolated from the Red Seaweed *Laurencia aldingensis* Against Toxic Effects of the Venom of the Snake, *Lachesis muta*. **Marine Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 619–629, 2016.

SILVA, M. A. C. DA; CAVALETT, A.; SPINNER, A.; *et al.* Phylogenetic identification of marine bacteria isolated from deep-sea sediments of the eastern South Atlantic Ocean. **SpringerPlus**, v. 2, n. 127, p. 1–10, 2013.

SINGH, A.; RAUTELA, R.; CAMEOTRA, S. Substrate dependent in vitro antifungal activity of *Bacillus* sp strain AR2. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 67, p. 1–11, 2014.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 174, p. 1–15, 2016.

SMYTH, T. J. P.; PERFUMO, A.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. (K. N. Timmis, Ed.) **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, v. 1, n. ii, p. 1–6, 2010.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; *et al.* Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 32, p. 12115–12120, 2006.

SPIEKERMANN, P.; REHM, B. H. A.; KALSCHEUER, R.; BAUMEISTER, D.; STEINBÜCHEL, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Archives of Microbiology**, v. 171, n. 2, p. 73–80, 1999.

SREETHAWONG, T.; CHATSIRIWATANA, S.; RANGSUNVIGIT, P.; CHAVADEJ, S. Hydrogen production from cassava wastewater using an anaerobic sequencing batch reactor: Effects of operational parameters, COD:N ratio, and organic acid composition. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 9, p. 4092–4102, 2010.

STAHL, E. (ED.). **Thin-Layer Chromatography**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1969.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition. APHA American Public Health Association, 1998.

STRATFORD, M.; STEELS, H.; NEBE-VON-CARON, G.; *et al.* Extreme resistance to

weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 126–134, 2013.

STUBBE, J.; TIAN, J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of PHA synthase. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 5, p. 445–457, 2003.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, n. 10, p. 1503–1555, 2000.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 148–175, 2007.

TAKAHASHI, R. Y. U. **Bioprospecção de bactérias marinhas para a produção de polihidroxicanoatos**, 2012. Universidade do Vale do Itajaí.

TAN, D.; WU, Q.; CHEN, J. C.; CHEN, G. Q. Engineering *Halomonas* TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. **Metabolic Engineering**, v. 26, p. 34–47, 2014.

TAN, D.; XUE, Y. S.; AIBAI DULA, G.; CHEN, G. Q. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8130–8136, 2011.

TAN, G. Y. A.; CHEN, C. L.; LI, L.; *et al.* Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. **Polymers**, v. 6, n. 3, p. 706–754, 2014.

TAPIA, F.; VÁZQUEZ-RAMÍREZ, D.; GENZEL, Y.; REICHL, U. Bioreactors for high cell density and continuous multi-stage cultivations: options for process intensification in cell culture-based viral vaccine production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2121–32, 2016.

THAI, C. C. D.; MOGHADDAM, L.; DOHERTY, W. O. S. Calcium phosphate flocs and the clarification of sugar cane juice from whole of crop harvesting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 1573–1581, 2015.

THAVASI, R. Microbial biosurfactants: A potential source for green chemicals. **Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology**, v. 4, n. 2, p. 1, 2013.

THOMPSON, J. L.; HINTON, M. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on *Salmonellas* in the crop. **British Poultry Science**, v. 38, n. 1, p. 59–65, 1997.

TOLEDO, F. L.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; CALVO, C. Production of bioemulsifier by *Bacillus subtilis*, *Alcaligenes faecalis* and *Enterobacter* species in liquid culture. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8470–8475, 2008.

USDA. **National Nutrient Database for Standard Reference**, Release28. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>>. Acesso em: 19/10/2016.

UZOIGWE, C.; BURGESS, J. G.; ENNIS, C. J.; RAHMAN, P. K. S. M. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. April, p. 1–6, 2015.

UZYOL, K. S.; AKBULUT, B. S.; DENIZCI, A. A.; KAZAN, D. Thermostable α -amylase from moderately halophilic *Halomonas* sp. AAD21. **Turkish Journal of Biology**, v. 36, n. 3, p. 327–338, 2012.

VAN-THUOC, D.; QUILLAGUAMÁN, J.; MAMO, G.; MATTIASSON, B. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1.

Journal of Applied Microbiology, v. 104, n. 2, p. 420–428, 2008.

VELMURUGAN, S.; RAMAN, K.; THANGA VIJI, V.; *et al.* Screening and characterization of antimicrobial secondary metabolites from *Halomonas salifodinae* MPM-TC and its in vivo antiviral influence on Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* against WSSV challenge. **Journal of King Saud University - Science**, v. 25, n. 3, p. 181–190, 2013.

VERLINDEN, R. A.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 1–8, 2011.

VIJAYENDRA, S. V. N.; RASTOGI, N. K.; SHAMALA, T. R.; *et al.* Optimization of polyhydroxybutyrate production by *Bacillus* sp. CFR 256 with corn steep liquor as a nitrogen source. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, n. June, p. 170–175, 2007.

WANG, G. XIANG; GAO, Y.; HU, B.; *et al.* A novel cold-adapted b-galactosidase isolated from *Halomonas* sp. S62: Gene cloning, purification and enzymatic characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 1473–1480, 2013.

WANG, Q.; SUN, J.; ZHANG, C.; *et al.* Polyhydroxyalkanoates in waste activated sludge enhances anaerobic methane production through improving biochemical methane potential instead of hydrolysis rate. **Scientific Reports**, v. 6, n. 19713, p. 1–9, 2016.

WECKER, P.; MOPPERT, X.; SIMON-COLIN, C.; COSTA, B.; BERTEAUX-LECELLIER, V. Discovery of a mcl-PHA with unexpected biotechnical properties: the marine environment of French Polynesia as a source for PHA-producing bacteria. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2015.

WEI, Y. H.; CHEN, W. C.; HUANG, C. K.; *et al.* Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 1, n. 1, p. 252–265, 2011.

WEISSGRAM, M.; GSTÖTTNER, J.; LORANTFY, B.; *et al.* Generation of PHB from spent sulfite liquor using halophilic microorganisms. **Microorganisms**, v. 3, n. 2, p. 268–289, 2015.

WHITE, D. A.; HIRD, L. C.; ALI, S. T. Production and characterization of a trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 744–755, 2013.

WILLERSINN, C.; MACK, G.; MOURON, P.; KEISER, A.; SIEGRIST, M. Quantity and quality of food losses along the Swiss potato supply chain: Stepwise investigation and the influence of quality standards on losses. **Waste Management**, v. 46, p. 120–132, 2015.

WILLIAMSON, A.; SANTI, C. DE; ALTERMARK, B.; KARLSEN, C.; HJERDE, E. Complete genome sequence of *Halomonas* sp. R5-57. **Standards in Genomic Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2016.

WINTERBURN, J. B.; RUSSELL, A. B.; MARTIN, P. J. Characterisation of HFBII biosurfactant production and foam fractionation with and without antifoaming agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 911–920, 2011.

XIAO, N.; JIAO, N. Formation of polyhydroxyalkanoate in aerobic anoxygenic phototrophic bacteria and its relationship to carbon source and light availability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 21, p. 7445–7450, 2011.

XU, F.; HUANG, S.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, S. Comparative study on the production of poly(3-hydroxybutyrate) by thermophilic *Chelatococcus daeguensis* TAD1: A good candidate for large-scale production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 9,

p. 3965–3974, 2014.

XU, J.; CHEN, Y.-Q.; ZHANG, H.-J.; *et al.* Effect of acetic acid on citric acid fermentation in an integrated citric acid-methane fermentation process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 1, p. 376–87, 2014.

YORK, G. M.; JUNKER, B. H.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. Accumulation of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 14, p. 4217–4226, 2001.

YUE, H.; LING, C.; YANG, T.; *et al.* A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 108, p. 1–12, 2014.

ZACCAI, G. The effect of water on protein dynamics. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 359, n. 1448, p. 1269–75, 1323–8, 2004.

ZHANG, C.; KIM, S.-K. Research and application of marine microbial enzymes: status and prospects. **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1920–34, 2010.

ZHANG, Y.; SUN, W.; WANG, H.; GENG, A. Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 307–314, 2013.

ZHAO, X.-Q. Genome-based studies of marine microorganisms to maximize the diversity of natural products discovery for medical treatments. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, n. 384572, p. 1–11, 2011.

ZONARI, A.; NOVIKOFF, S.; ELECTO, N. R. P.; *et al.* Endothelial differentiation of human stem cells seeded onto electrospun polyhydroxybutyrate/polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate fiber mesh. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–9, 2012.

ZYL, C. VAN; PRIOR, B. A.; PREEZ, J. C. DU. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, n. 1–3, p. 357–369, 1988.

8. ANEXOS

8.1 Substâncias analisadas no ensaio de multirresíduos de agrotóxicos realizado pelo Laboratório de Agroquímica do Instituto de Tecnologia do Paraná.

Centro de Ensaios Tecnológicos

Laboratório de Agroquímica

Revisão 00

Relatório de Ensaios Tecpar Nº 14013690

Cliente: MIGUEL DANIEL NOSEDA
Endereço: Rua Coronel Francisco H. dos Santos, 100 – Curitiba / PR
Período de realização dos ensaios: 15/01/2015 a 27/01/2015

1. MATERIAL

Amostra: Efluente da prensagem de frutas e verduras

Data e hora da coleta: 11/12/2014, 11h 00min

Responsável pela coleta: Carlos Eduardo Sanchuki

2. SERVIÇO REALIZADO

Ensaio de multirresíduos de agrotóxicos em água.

3. METODOLOGIA

Multirresíduos de agrotóxicos: cromatografia a líquido com detecção por espectrometria de massas sequencial – LC-MS/MS.

Agroquímicos pesquisados: 2,4-D (ácido 2 4-diclorofenoxiacético), 3-hidroxi-carbofurano, abamectina, alacloro, aldicarbe, aldicarbe sulfona, aldicarbe sulfóxido, aletrina, ametrina, atrazina, azinófos etílico, azinófos metílico, azoxistrobina, bentazona, benzoato de emamectina, bifentrina, carbaril, carbendazina, carbofurano, carbosulfano, cimoxanil, cipermetrinas, ciproconazol, ciprodinil, cletodim, clofentezina, clomazona, clorfenvinfós, clorimurum etílico, clorpirifós etílico, clorpirifós metílico, cresoxim metílico, deltametrina, demeton (O+S), diazinona, diclorvós, difenoconazol, dimetoato, dissulfotom, diurom, epoxiconazol, etiona, fenamifós, fenarimol, fenhexamida, fenpiroximato, fenpropatrina, fenpropimorfe, fentoato, fentiona, fipronil, fluasifop-p-butilico, flufenoxurom, fluometuron, flutriafol, forato, fosalone, fosfolan, fosmete, hexaconazol, hexazinona, hexitiazoxi, imazalil, imidacloprido, indoxacarbe, iprodiona, lambda-cialotrina, linurom, lufenurom, malationa, metalaxil metílico, metamidafós, metconazol, metidationa, metiocarbe, metolaclo, metribuzim, metsulfurom metílico, mevinfós, molinato, ometoato, oxamil, paraoxom, parationa etilica, penconazol, pendimetalina, permetrina, picoxistrobina, piraclostrobina, pirazofós, piridabem, pirimetanil, pirimicarbe, pirimifós etílico, pirimifós metílico, piriproxifem, procloraz, profenofós, promecarbe, prometon, prometrina, propanil, propargito, propazina, propiconazol, propoxur, simazina, tebuconazol, tebutiurum, terbufós, tiabendazol, tiacloprido, tiametoxam, tiofanato metílico, tolclofós metílico, tolfluanida, triadimenol, triadimefom, triazofós, triclorfom, trifloxistrobina, triflumizol, triflumurom e vamidotona.

Limite de quantificação do método: 5 µg/L para cada um dos princípios ativos.

4. RESULTADO

Os princípios ativos pesquisados, acima relacionados, não foram detectados no material analisado.

Curitiba, 27 de Janeiro de 2015

ORLANDO DELAY JUNIOR
Químico CRQ 09201441

JOSÉ LAURENTINO FERREIRA
Técnico Químico CRQ 09401027
Gerente do Laboratório